

**AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS DE LA RIZOSFERA DE *Leucaena leucocephala* Y
EVALUACIÓN DE SU USO POTENCIAL EN LA REHABILITACIÓN DE SUELOS DEGRADADOS**

Paulo Cesar Daza Ortiz

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE MEDELLÍN
FACULTAD DE CIENCIAS
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA
2010**

**AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS DE LA RIZOSFERA DE *Leucaena leucocephala* Y
EVALUACIÓN DE SU USO POTENCIAL EN LA REHABILITACIÓN DE SUELOS DEGRADADOS**

PAULO CESAR DAZA ORTIZ
Ingeniero Forestal

Trabajo de investigación presentado como requisito para optar al título de
Magíster en Biotecnología

DIRECTOR
NELSON WALTER OSORIO VEGA I.A, Ph.D
Profesor Asociado, Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias. Sede Medellín.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE MEDELLÍN
FACULTAD DE CIENCIAS
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA
2010

**AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS DE LA RIZOSFERA DE *Leucaena leucocephala* Y
EVALUACIÓN DE SU USO POTENCIAL EN LA REHABILITACIÓN DE SUELOS DEGRADADOS**

Por

PAULO CESAR DAZA ORTIZ

JURADO 1

JURADO 2

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE MEDELLÍN
FACULTAD DE CIENCIAS
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA
2010**

DEDICATORIA

*A mi madre
Quien ha sido el motor de mi vida*

AGRADECIMIENTOS

Como autor quisiera expresar mis más sinceros agradecimientos a:

Profesor Nelson Walter Osorio Vega, concejero y amigo que con sus aportes, orientación y confianza permitió sacar adelante este trabajo.

Laura Patricia Posada, indiscutible amiga a quien debo en un altísimo porcentaje haber logrado esta meta en mi vida.

Elizabeth Quiroz, por su infinita paciencia, tolerancia y colaboración en los momentos más difíciles.

El personal del laboratorio de Microbiología del Suelo de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. Lugar donde se llevo a cabo este proyecto de investigación.

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	9
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	11
2. OBJETIVOS	14
2.1. Objetivo General	14
2.2. Objetivos Específicos	14
3. MARCO TEÓRICO	15
3.1. Especies Forestales	15
3.2. Microorganismos	16
3.2.1. Hongos Formadores de Micorrizas (HFM)	17
3.2.2. Microorganismos Solubilizadores de Roca (MSR)	17
3.2.3. Microorganismos Fijadores de Nitrógeno (FBN)	18
4. MATERIALES Y MÉTODOS	20
4.1. Localización	20
4.2. Aislamiento de Microorganismos	20
4.3. Prueba <i>in vitro</i>	21
4.4. Experimento en Invernadero	22
4.5. Diseño Experimental	23
4.6. Variables Respuesta	24
5. Resultados y Discusión	26
5.1. Altura de las plantas	27
5.2. Masa Seca de Raíces	29
5.3. Masa Seca Aérea (MSA)	31
5.4. Contenido de (P) en la pínula y (P) total absorbido (PTA)	32
6. CONCLUSIONES	34
7. BIBLIOGRAFÍA	36
8. ANEXOS	47

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1.	Colonias individuales de FBN aislados de <i>Leucaena</i> , MSR y esporas de HFM de Acacia respectivamente.	21
Figura 2.	Curva estándar de concentración de (P) en solución Vs absorbancia para la determinación de (P) en solución generado por la actividad de los MSR seleccionados en el proceso de aislamiento y purificación.	22
Figura 3.	Plantas de <i>Leucaena leucocephala</i> en crecimiento.	23
Figura 4.	Determinación de la altura de <i>Leucaena leucocephala</i> al momento de cosechar.	24
Figura 5.	Secado de masa seca aérea y raíces.	25
Figura 6.	Colecta de la cuarta pínula de <i>Leucaena leucocephala</i> para determinación de contenido de (P) foliar.	25
Figura 7.	Altura de plantas de <i>Leucaena leucocephala</i> en función de la inoculación individual y combinada.	28
Figura 8.	Altura de plantas de <i>Leucaena leucocephala</i> inoculada con HFM frente a las no inoculadas.	28
Figura 9.	Masa seca de la raíz de plantas de <i>Leucaena leucocephala</i> en función de la inoculación individual y combinada.	30
Figura 10.	Masa seca aérea de plantas de <i>Leucaena leucocephala</i> en función de la inoculación individual y combinada.	31
Figura 11.	Fósforo absorbido en la parte aérea de plantas de <i>Leucaena leucocephala</i> en función de la inoculación individual y combinada.	33

LISTA DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1.	Resultados y análisis de varianza del ensayo <i>in vitro</i> para determinar solubilización microbial de roca fosfórica en mg P.L. ⁻¹	26
Tabla 2.	Aislamiento de esporas de suelo rizosférico provenientes de la zona de estudio.	27

LISTA DE ANEXOS

		Pág.
Anexo 1.	Valores y diferencias estadísticas de cada una de las variables respuesta frente a cada uno de los tratamientos.	47
Anexo 2.	ANAVA separando en los tratamientos los siete componentes de la varianza para la variable respuesta altura.	47
Anexo 3.	ANAVA separando en los tratamientos los siete componentes de la varianza para la variable respuesta peso seco raíz.	48
Anexo 4.	ANAVA separando en los tratamientos los siete componentes de la varianza para la variable respuesta peso seco aéreo.	48
Anexo 5.	ANAVA separando en los tratamientos los siete componentes de la varianza para la variable respuesta Fósforo Total Absorbido.	49
Anexo 6.	Concentración foliar de (P) en la cuarta pínula de <i>Leucaena leucocephala</i> , en respuesta a los distintos tratamientos.	49
Anexo 7.	Análisis de suelos antes y después del ensayo en invernadero	50

RESUMEN

Un experimento de invernadero se realizó para determinar los efectos de la inoculación individual y combinada con un hongo formador de micorriza arbuscular (HFM), un microorganismo solubilizador de fosfato (MSR) y una bacteria fijadora de nitrógeno (FBN) sobre el crecimiento de plántulas de *Leucaena leucocephala*. Las plántulas crecieron en un suelo deteriorado, el cual se obtuvo de un terreno degradado por minería de aluvión en la región del Bajo Cauca Antioqueño. Los microorganismos fueron obtenidos de suelo rizosférico alrededor de las raíces de plantas de *Leucaena leucocephala* y *Acacia mangium* que crecían con un buen desarrollo a pesar de hallarse en un suelo deteriorado. Los microorganismos fueron escogidos basados en la consideración de que su actividad podría ser clave para garantizar el establecimiento de plantas en este suelo deteriorado. Una prueba *in vitro* se empleó para escoger el más efectivo MSR; el hongo micorrizo-arbuscular se seleccionó por poseer una alta abundancia de esporas en el suelo degradado; la bacteria fijadora de N (FBN) se seleccionó porque formaba nódulos en las raíces de *Leucaena* en tales suelos. Se empleó un diseño completamente al azar con arreglo factorial de tratamientos (2x2x2) y cada tratamiento tuvo cinco repeticiones. En general, las plantas no crecieron bien en este suelo deteriorado. La inoculación micorrizal (HFM) fue el único tratamiento efectivo para promover la absorción vegetal de fosfato y el crecimiento de las plántulas de *Leucaena* por encima del control. Los efectos benéficos de la inoculación micorrizal fueron reducidos cuando el hongo micorrizal fue co-inoculado con MSR y/o FBN. Probablemente, esto se pudo deber a que los microorganismos compitieron por sustratos carbonáceos liberados por las plantas, los cuales pudieron ser muy escasos dado las condiciones desfavorables del suelo (alto contenido de arena, pobre estructura, baja retención de agua, bajo contenido de materia orgánica) que dificultaron el desarrollo vegetal.

Palabras clave: Co-inoculación, rehabilitación de áreas degradadas, inoculación micorrizal, *Leucaena leucocephala*

SUMMARY

A greenhouse experiment was carried out to evaluate the effect of individual or combined inoculation with a mycorrhizal fungus (HFM), a phosphate solubilizing microorganism (MSR), and a nitrogen fixing bacterium (FBN) on *Leucaena leucocephala* seedlings growth. Plants were grown in a deteriorated soil, which was obtained from a land degraded by alluvial mining in the Antioquia's "Bajo Cauca" area. Microorganisms were obtained from rhizospheric soil around roots of *Leucaena leucocephala* and *Acacia mangium* grown in the area of study that exhibited a good development. Soil microorganisms were chosen based on the consideration that their activities could be key to guarantee plant establishment in this deteriorated soil. An *in vitro* test was conducted to determine the most effective MSR, the HFM was selected based on its higher spore abundance, and the FBN was chosen giving its ability to form root nodules with leucaena. A completely randomized experimental design was employed using a factorial arrangement of treatments (2x2x2), each treatment had five replicates. In general, plants did not grow well in this deteriorated soil. The HFM inoculation was the only effective treatment to promote plant phosphorus uptake and growth of leucaena seedlings over the control. The beneficial effects of HFM inoculation were reduced when the mycorrhizal fungus was co-inoculated with MSR and/or FBN. Likely, this could be due to competition among microbes for carbonaceous substrates released by plants, which could be scarce given the stressing soil conditions (sandy soil, poor structure, low water holding capacity, low soil organic matter) that impaired plant development.

Key words Co-inoculation, remediation of degraded land, mycorrhiza, *Leucaena leucocephala*

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

En Colombia y especialmente en la zona del bajo Cauca Antioqueño la actividad minera de aluvión es una de las principales actividades económicas y una de las más nocivas para el ambiente, pues conduce a una alteración extrema del equilibrio ecológico (Sánchez *et al.* 2003).

La minería de aluvión ha conllevado a la degradación de los suelos, generando cambios en el uso del mismo y fuertes impactos ambientales (Medina *et al.* 2009); que incluyen la pérdida total de la vegetación, de los horizontes superficiales del suelo y de la población microbial asociada a ellos (Álvarez *et al.* 1997; Rendón, 1998). Generando por ende que en la superficie del suelo quede expuesta una matriz conformada por horizontes C y depósito aluvial.

La topografía del terreno cambia drásticamente, se forman cárcavas profundas y depósitos de material rocoso, también se pierde porosidad y se restringe la actividad biológica del suelo (Orozco & Gómez, 1994). En consecuencia, los contenidos de materia orgánica son muy bajos, hay un deterioro severo de la estructura del suelo y de sus condiciones fisicoquímicas, se favorece la sedimentación de las fuentes hídricas, generando la pérdida de la fauna íctica y por consiguiente, la de una representativa fuente de alimento e ingresos para las comunidades de la zona.

Los ecosistemas pierden casi totalmente su diversidad y su capacidad de auto restauración; dejando de cumplir funciones ecológicas como la generación de hábitat para la fauna, regulación hídrica, control de la erosión, aporte, descomposición e incorporación de materia orgánica al suelo, corredores biológicos, sumideros de carbono, etc.

Sumado a lo anterior, la actividad minera genera desechos tóxicos como residuos de aceites y combustibles, además de metales pesados que se precipitan y quedan haciendo parte del medio por largos periodos de tiempo. Esto dificulta el restablecimiento de la vegetación y la consiguiente colonización de la microbiota del suelo, que según Botelho *et al.* (2006) es un buen indicador de la calidad ambiental de un área en particular.

Dentro de los efectos asociados a la degradación de los ecosistemas por la explotación minera no sólo se tienen los relacionados con la biología del medio, sino que además se genera una fuerte incidencia en las poblaciones dependientes de estos. Las poblaciones humanas cuando el impacto es a gran escala dependen de los recursos agrícolas de otras regiones, lo que genera sobre costos y un cambio drástico en la dieta, afectando negativamente la seguridad y soberanía alimentaria, la economía local y las posibilidades de ingreso extra como la extracción de madera y otros productos del bosque. En general, se limitan las actividades agrícolas, pecuarias y forestales de estos suelos y, por ende, las posibilidades de desarrollo y empleo de los habitantes de tales zonas (Allen, 1989).

Se sabe que muchas actividades antropogénicas, tales como el crecimiento de las ciudades, la agricultura, el uso de pesticidas, la polución y en este caso en particular la minería y el uso de metales pesados, pueden afectar la diversidad microbial. Sin embargo, es poco conocido como los microorganismos que toleran estos niveles de deterioro pueden ejercer influencia en el restablecimiento del equilibrio ecológico. Por lo tanto es de entera validez realizar estudios que ayuden a resolver esta inquietud.

Diversos estudios muestran que para rehabilitar estas áreas devastadas por la minería es necesaria una adecuada planificación del proceso de rehabilitación, lo cual permite reducir el tiempo de sometimiento de estas áreas al impacto ambiental causado y restituir potencialmente la diversidad biológica y la productividad ecosistémica (Sánchez *et al.* 2003).

Para ello se hace indispensable la utilización de especies vegetales capaces de adaptarse a estos suelos degradados, sin embargo, es común el fracaso de estas plantaciones debido a la baja disponibilidad de nutrientes (principalmente fósforo y nitrógeno) y a las deficientes condiciones físicas de los suelos (Ferrari & Wall, 2004).

De lo anterior se deriva que para el establecimiento de plantas en suelos degradados, es necesaria la inoculación con microorganismos benéficos que ayuden en la toma de los escasos nutrientes existentes en el suelo y permitan un eficiente reciclado externo de los mismos a través de la descomposición de hojarasca y de raíces muertas. Estos microorganismos pueden ser: hongos formadores de micorrizas (**HFM**) que favorecen la absorción de agua y nutrientes (Miller & Jastrow, 1990; Chen *et al.* 2005); microorganismos solubilizadores de roca (**MSR**) que ayudan a la liberación de los nutrientes que se hallan adsorbidos o precipitados (Vessey, 2003; de-Bashan *et al.* 2007) y los microorganismos fijadores de Nitrógeno (**FBN**) que fijan el nitrógeno (N_2) biológicamente de forma simbiótica o de vida libre (Vance, 2001). Por lo que han sido ampliamente usados en programas de rehabilitación de suelos en varias partes del mundo (Sieverding, 1988; Brundrett *et al.* 1996; Bashan *et al.* 2006).

La inoculación con microorganismos benéficos es una práctica común en agricultura y silvicultura en países desarrollados (Bashan *et al.* 2004). Dichos microorganismos son parte integral de los procesos de revegetalización y reforestación, y pueden ser usados como una herramienta biotecnológica para reducir la erosión del suelo (Bashan *et al.* 2007) y acelerar los procesos de rehabilitación de zonas degradadas.

En la literatura referente al tema, se registran estudios donde se ha determinado que hay efectos benéficos en el desarrollo de las plantas mediante la co-inoculación con microorganismos fijadores biológicos de N_2 y solubilizadores de roca (Rudresh *et al.* 2005; Galindo *et al.* 2006; Rosas *et al.* 2006; Parvaze *et al.* 2007); microorganismos solubilizadores de roca y hongos formadores de micorriza (Satpal & Kapoor, 1998; Osorio, 2003; Souchie *et al.* 2006); Hongos formadores de micorriza y fijadores biológicos de N_2 (Antunes *et al.* 2006; Roy *et al.* 2007; Matias *et al.* 2009). Sin embargo, no hay registro del efecto de la inoculación entre **HFM**, **MSR** y **FBN** en forma conjunta sobre el desarrollo de las plantas leguminosas arbóreas y su efecto en la eficiencia de éstas para establecerse en áreas degradadas por minería.

Además, de la inoculación con microorganismos, la elección de las especies forestales a plantar también juega un papel importante en la restauración de estos suelos degradados por minería; los árboles fijadores de nitrógeno (**AFN**) son especies maderables que toleran ambientes muy degradados, asimismo juegan un papel primordial al incrementar el nivel de nitrógeno en el suelo debido a su capacidad de fijarlo de la atmósfera, a través de la simbiosis con bacterias en sus raíces y por medio del aporte de materia orgánica hecho al suelo a través de la caída periódica o estacional, natural o provocada (cosecha), de hojas, flores, frutos, ramas y raíces muertas. Además, sus raíces pueden absorber nutrientes de capas profundas del suelo y traerlos a la superficie, haciéndolos disponibles para la pastura o para el cultivo agrícola asociado. En algunos casos, pueden incrementar la disponibilidad de fósforo (simbiosis con micorrizas), calcio, potasio y magnesio (Botero & Russo, 2005).

Con base a lo anterior, se planteó la necesidad de realizar un proyecto que consistió en el aislamiento de microorganismos solubilizadores de roca (**MSR**), formadores de micorriza (**HFM**) de la rizosfera de *Acacia mangium*, y fijadores biológicos de nitrógeno (**FBN**) de nódulos de *Leucaena leucocephala* y la evaluación de su efecto en forma individual y combinada sobre el desarrollo y establecimiento de *Leucaena leucocephala* en un suelo proveniente de áreas degradadas por minería de aluvión en el Bajo Cauca Antioqueño.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Aislar microorganismos de la rizosfera de plantas de *Leucaena leucocephala* y *Acacia mangium* que se desarrollen adecuadamente en zonas degradadas por minería de aluvión y evaluar su uso potencial en la rehabilitación de dichos suelos usando *Leucaena leucocephala* como indicadora.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- (i) Aislar microorganismos fijadores de N₂ (**FBN**), solubilizadores de roca (**MSR**) y formadores de micorrizas (**HFM**) que habiten en la rizosfera de plantas de *Acacia mangium* y *Leucaena leucocephala* que crezcan adecuadamente en suelos degradados de la zona de estudio.
- (ii) Evaluar bajo condiciones *in vitro* la actividad y capacidad de multiplicación de cada uno de los microorganismos aislados y seleccionar aquellos que de acuerdo a su grupo funcional, puedan ser considerados útiles para la producción de inóculos promisorios en la rehabilitación de suelos degradados.
- (iii) Evaluar el efecto de la inoculación individual y combinada de los microorganismos seleccionados a través de la prueba *in vitro* sobre el desarrollo de plántulas de *Leucaena leucocephala* en un ensayo en invernadero.

3. MARCO TEORICO

En Colombia, los depósitos aluviales más importantes se vienen explotando de manera informal desde la época de la colonia y de forma industrial a partir de finales del siglo XIX, con la llegada de las empresas extranjeras asentadas principalmente en el Chocó y en el Bajo Cauca Antioqueño (López, 2009).

La utilización de las técnicas y las tecnologías no apropiadas han llevado a la actividad minera a un estado de insostenibilidad, el cual afecta negativamente en los ecosistemas locales intervenidos con esta actividad. El cambio obligado del uso del suelo ha generado grandes conflictos a nivel socioeconómico y ambiental, dado que esto presiona el cambio de las actividades tradicionales, la pérdida de costumbres y la alteración de los hábitos de producción, elementos seculares encargados de sostener el equilibrio ecosistémico de la región (López, 2009).

Sin embargo, la revegetalización de estas áreas sea con especies de bajo porte como pasturas y/o especies arbustivas y/o arbóreas forestales, bajo un manejo adecuado y apoyo biotecnológico, en este caso mediante la generación de asociaciones con algunos microorganismos funcionales, podría favorecer la recuperación de estos suelos degradados mejorando sus propiedades físicas, químicas y biológicas y por tanto la calidad de vida de los habitantes de estas regiones.

3.1. Especies Forestales

La ***Acacia mangium*** y la ***Leucaena leucocephala*** son dos especies forestales que se adaptan muy bien a las condiciones bioclimáticas de la zona del Bajo Cauca Antioqueño y que contribuyen de forma natural a la recuperación de estos suelos degradados por minería de aluvión.

La ***Acacia mangium*** es una especie arbórea que pertenece a la familia Mimosaceae, es nativa del noreste de Australia, Papua Nueva Guinea y del este de Indonesia y las Islas Molucas (CATIE, 1992). Su madera posee poca albura y cuenta con un duramen duro y fuerte, es de color café claro, tiene buena durabilidad si no está en contacto directo y prolongado con la humedad del suelo. Su madera es moderadamente pesada con una gravedad específica de 0.5 g/cm³, es de fácil secado y trabajo (CATIE, 1992).

Es una planta de crecimiento rápido en condiciones de bosque húmedo tropical (bh-T) y muy húmedo tropical (bmh-T), sobretodo en zonas con una topografía relativamente plana. En su hábitat natural puede alcanzar alturas de 25-30 m y hasta 90 cm de diámetro a la altura del pecho (**DAP**), presenta un fuste recto y libre de ramas hasta las dos terceras partes de su altura total. Sin embargo, fuera de su hábitat tiende a bifurcarse. Su producción en vivero es relativamente fácil, no obstante, se ha observado que para su óptima germinación y desarrollo es necesario tener cuidado ya que es atacada en su estado inicial principalmente por *Fusarium* spp. y *Phyllosticta* spp. (Jiménez & Picado, 1987).

Según Oliva y Hughell (1990), esta especie ha demostrado su mejor desarrollo cuando ha sido plantada en zonas con precipitación media anual entre 1000 y 4500 mm, altitud máxima sobre el nivel medio del mar de 850 m y una temperatura promedio anual de 26-27°C, condición ambiental que está perfectamente acorde con la del Bajo Cauca Antioqueño.

Por su lado ***Leucaena leucocephala*** es una planta arbórea de bajo porte perteneciente a la familia Mimosaceae, es nativa de la región norte de Centro América y se distribuye hasta la región norte de Suramérica (Zárate, 1987). Es una especie que crece adecuadamente de los 0 a 900 metros de altura sobre el nivel medio del mar, tiene la capacidad de prosperar en ambientes adversos y en un amplio rango de humedad que va desde los 600 hasta 3800 mm anuales (Trujillo, 2007). Aunque, es exigente en cuanto a cantidad de radiación solar, también tolera ciertos niveles de sombra lo que la hace adecuada para el establecimiento junto a otras especies o como planta pionera en ambientes degradados.

La temperatura media anual a la que se desarrolla la *Leucaena* oscila entre los 22 a 30°C condición que se da en el Bajo Cauca Antioqueño, es bastante intolerante a suelos muy ácidos inferiores a pH 5.5, su semilla es ortodoxa y se deja almacenar hasta por un año sin perder viabilidad en su germinación (Trujillo, 2007). Además presenta una raíz profunda y extendida que puede aprovechar agua y minerales desde aquellas zonas que para muchas plantas agrícolas son inaccesibles.

Según Parrota (1992), las raíces laterales horizontales y pequeñas en las capas de suelo aireado superficial forman asociaciones simbióticas con facilidad con las bacterias fijadoras de nitrógeno de la familia *Rhizobiaceae*. Las tasas de fijación anual de nitrógeno en la *Leucaena* han sido calculadas tan altas como de 110 kg/ha bajo condiciones de campo. La nodulación parece ser influenciada fuertemente por la reacción del suelo y es pobre a unos valores de pH de menos de 5.5. Además de *Rhizobium* spp., las raíces finas y los vellos radicales se encuentran infectados con micorrizas vesículo arbusculares (MVA), las cuales mejoran la nutrición por fósforo y demás elementos de baja movilidad en el suelo y las relaciones de agua en la *Leucaena*. En los suelos tropicales deficientes en fósforo, la inoculación dual con *Rhizobium* spp. y MVA mejora en gran medida el crecimiento de las plántulas.

La *Leucaena* es además una planta usada como forrajera para ganado bovino debido a su alto contenido proteico y además por su efecto modulador de la población celulolítica del rumen (Galindo *et al.* 2008), también se usa en la crianza ganado caprino, ovino, aves de corral y en piscicultura; asimismo, su madera es utilizada en construcciones livianas, pisos, durmientes, como pulpa de fibra corta, postes, leña y carbón de alta calidad entre otros muchos usos, de los cuales se destacan la extracción de gomas (Abed El Kaeder *et al.* 2008), aceites aromáticos y colorantes, el uso de las semillas en artesanías y sus flores como fuente de azúcar para sistemas apícolas. (Trujillo, 2007; Zárate, 1987). Todas las características anteriormente mencionadas hicieron que esta planta fuera la escogida para realizar este estudio.

3.2. Microorganismos

Todos los organismos de la biosfera dependen de la actividad microbial, ya que los microorganismos del suelo son fundamentales en la continuidad del ciclaje de nutrientes y el funcionamiento de los ecosistemas terrestres (Pace, 1997; Van der Heijden *et al.* 1998; Cairney *et al.* 1997; Klironomos *et al.* 2000; Ovrea, 2000; Souchie *et al.* 2006).

Nuestro conocimiento acerca de la diversidad microbial del suelo es limitada, dada nuestra incapacidad para estudiarlos todos (Torsvik *et al.* 1990), y aunque muchos hongos y bacterias del suelo no pueden ser cultivadas por los métodos actuales de laboratorio (Thorn, 1997; Torsvik *et al.* 1998; van Elsas *et al.* 2000) se sabe que estos juegan un papel importante en varios de los ciclos biogeoquímicos (Molin & Molin, 1997; Trevors, 1998; Wall & Virginia, 1999).

Además, son sumamente influyentes en la nutrición (George *et al.* 1995; Timonen *et al.* 1996; Souchie *et al.* 2006), salud de las plantas (Avis *et al.* 2008; Srivastava *et al.* 1996; Fillion *et al.* 1999; Smith & Goodman, 1999), y la estructura (Wright & Upadhyaya, 1998; Dodd *et al.* 2000) y fertilidad del suelo (Yao *et al.* 2000; O'Donnell *et al.* 2001; Fernández *et al.* 2007).

3.2.1. Hongos Formadores de Micorriza (HFM)

Son mutualistas obligados, que forman una asociación simbiótica con la raíz de la mayoría de las plantas terrestres (Bashan *et al.* 2007). Desarrollan una amplia red de hifas externas alrededor del sistema de raíces de la planta hospedera, que le permiten captar nutrientes de lenta movilidad, principalmente fósforo, desde la solución del suelo.

Los **HFM** tienen repercusión directa en el crecimiento, producción de masa seca y concentración de P en la planta (Barea *et al.* 2009; Bolan, 1991). Adicionalmente, participan activamente en el mejoramiento de la estructura del suelo (Burbano 1989; Miller & Jastrow 1990; Tisdall 1991; Degens 1997), a través de la producción de una proteína llamada glomalina que actúa como pegamento de las partículas orgánicas e inorgánicas (Wright *et al.* 1996; Wright & Upadhyaya 1996, 1998). Es claro que la buena estructura del suelo es necesaria para mantener su integridad y permitir la infiltración de agua y aire lográndose un mejor desarrollo de la vegetación (Brady & Weil, 2002).

Aunque, varios autores tales como Uhlmann *et al.* (2006); Garcia *et al.* (1999); Requena *et al.* (1996), entre otros, han descrito la colonización de la raíz por parte de los **HFM** como un componente esencial del sistema planta, principalmente en ambientes áridos y degradados. Las hifas de estos hongos solo mejoran la eficiencia para absorber nutrientes al incrementar la superficie de exploración y aumentar su movilidad, pero tienen poco o ningún efecto en la solubilidad de las partículas inorgánicas nativas del suelo o de enmiendas como la roca fosfórica que es de muy baja solubilidad (Osorio, 2003).

3.2.2. Microorganismos Solubilizadores de Roca (MSR)

Se acepta que las reacciones de solubilización ocurren mayormente en la rizosfera presente en horizontes superficiales donde hay mayor concentración de oxígeno y los compuestos carbonáceos son liberados en gran cantidad. Sin embargo Daza *et al.* (2006), hallaron en un estudio realizado en un andisol de Colombia, una alta densidad de MSR en la rizosfera de diferentes coberturas y a distintas profundidades, indicando que aunque la mayor actividad se da en los horizontes superficiales ésta no se restringe a ellos.

Se ha observado que las plantas aumentan la cantidad de exudados liberados a la zona radicular para favorecer un aumento en la población microbial asociada a ella, más aun, cuando la planta está en condiciones de estrés hídrico o nutricional (Souchie & de Souza Abboud, 2007). Lynch & Whipps (1990), hallaron que las plantas pueden liberar a la rizosfera hasta un 40 % del carbón total fijado por fotosíntesis para asegurar la asociación, lo que recalca la importancia de la caracterización de los microorganismos de la rizosfera, ya que muchos de

ellos, son heterótrofos y usan estos sustratos para producir ácidos orgánicos que afectan directamente la disponibilidad de nutrientes en la solución del suelo.

Existen Microorganismos Solubilizadores de Roca (**MSR**) como *Pseudomonas* spp., *Enterobacter* spp., *Bacillus* spp., *Penicillium* spp y *Aspergillus* spp, que solubilizan compuestos inorgánicos del suelo liberándolos de la mineralogía del mismo (Barea *et al.* 1975; Kim *et al.* 1998; Whitelaw, 2000), reversando así los procesos de adsorción o precipitación (Rao, 1992). Aunque, las bacterias han recibido gran atención, Kucey (1983) indicó que los hongos son más efectivos solubilizando compuestos inorgánicos, además, que los subcultivos de bacterias pueden perder su habilidad para solubilizar contrario a los hongos que mantienen dicha capacidad a través del tiempo, asunto que facilita las cosas si se planea desarrollar productos industriales. El mismo autor encontró en Mollisoles de Canadá que el 0.5 % y 0.1 % de la población total de bacterias y hongos, respectivamente, exhibieron capacidad para solubilizar compuestos inorgánicos insolubles.

Sin embargo, se debe tener claro que los microorganismos con capacidad de solubilizar, solo cumplen la función de liberar los nutrientes a la solución del suelo y estos pueden ser re fijados dependiendo de las características mineralógicas del mismo, o simplemente lixiviarse y no ser disponibles para las plantas.

Como estrategia de restauración de áreas degradadas o manejo de suelos con alta capacidad de fijación de fosfatos, la co-inoculación con **MSR** y **HFM** podría ser viable y superar las limitaciones mencionadas en cuanto a las deficiencias de estos por separado.

La doble inoculación tiene las siguientes ventajas: **(i)** plantas micorrizadas pueden liberar mayor cantidad de sustancias carbonáceas hacia la rizosfera que las no micorrizadas (Linderman, 1988), los **MSR** podrían usar estos sustratos carbonáceos para la producción de ácidos orgánicos en la rizosfera (Azcon & Barea, 1996). **(ii)** La extensiva red de hifas micorrizales formadas alrededor de las raíces podrían absorber el P y demás nutrientes liberados por los **MSR**, evitando así su re fijación o pérdida. Así mismo, una mayor capacidad para solubilizar la roca en el suelo podría estimular mayor crecimiento vegetal y favorecer la actividad micorrizal y la nodulación (Mishra *et al.* 2009; Toro *et al.* 1997; Souchie *et al.* 2005).

Por otro lado, Kohler *et al.* (2007), analizaron la interacción entre un **HFM** y un **MSR** y hallaron un incremento significativo en la actividad proteasa, ureasa y fosfatasa en la rizosfera de *Lactuca sativa*, además de un incremento significativo en los contenidos de P y K foliar. Ouahmane *et al.* (2007), determinaron que la co- inoculación entre estos dos tipos de microorganismos favorece el crecimiento de *Cupressus atlantica* G.

3.2.3 Microorganismos Fijadores de Nitrógeno (FBN)

Hoy día el tema de la fijación biológica del N₂ cobra valor dentro del contexto de la agricultura sostenible, ya que puede evitar el uso abusivo de fertilizantes nitrogenados con el consiguiente ahorro en el consumo de energía y la disminución de la degradación del medio.

A pesar de la abundancia de N₂ en la atmósfera, cercana al 80% (Ladha, 2003), éste no es aprovechable por las plantas que se ven obligadas a utilizar las formas combinadas que se encuentran en el suelo en cantidad insuficiente, mucho más en las zonas donde el contenido de materia orgánica del suelo y la población microbial han sido disminuidas drásticamente.

La tasa de fijación biológica de N_2 de forma asociativa puede ser hasta cientos de veces mayor que la fijación llevada a cabo por organismos de vida libre (Atlas & Bartha, 2002; Barrios, 2007). Por ejemplo, Dalton, (1974) y Burns & Hardy, (1975) hallaron que las asociaciones de rhizobios con alfalfa pueden fijar hasta $70 \text{ kg ha}^{-1}\text{año}^{-1}$; en cambio la tasa de fijación de *Azotobacter* oscila entre 0.5 y $2.5 \text{ Kg ha}^{-1}\text{año}^{-1}$. Por otro lado, se tiene que para los simbioses la fuente de energía son compuestos carbonados suministrados directamente por la planta derivados de la fotosíntesis, mientras que los fijadores libres de N_2 han de tomarlos del suelo donde no existen en las cantidades suficientes.

Dentro de las funciones realizadas por los microorganismos del suelo se tiene la fijación biológica del nitrógeno consistente en la reducción de N_2 a NH_3 (Galloway & Cowling, 2002). Esta actividad es crucial en el ciclo biogeoquímico del nitrógeno. Aunque este elemento es indispensable en la formación de proteínas, ácidos nucleídos y clorofila (Urzua, 2005; Ouzounidou *et al.* 2007), el proceso de fijación biológica donde el N_2 es reducido a amonio e incorporado a la biosfera sólo puede ser llevado a cabo por unos pocos grupos de seres vivos, todos ellos procariotas (Sprent & Sprent, 1990).

En resumen tenemos que las asociaciones fijadoras de N_2 entre rhizobios y plantas leguminosas tiene una gran importancia en el ciclo global del nitrógeno y en la agricultura (Barrios, 2007; Somasegaran & Hoben, 1994; Evans *et al.* 1991; Postgate, 1992). Luego de la formación del nódulo producto de la asociación, las bacterias fijadoras convierten el nitrógeno atmosférico en amoniaco, compuesto necesario para el adecuado desarrollo de la planta y de las propias bacterias (Dillworth & Glenn, 1991).

Todo lo anterior hace indispensable la evaluación de la influencia este tipo de microorganismos en el desarrollo de las plantas, por si solos ó en asociación con otros, como los **HFM** y los **MSR**. Por ejemplo Wani *et al.*, (2007). Hallaron que la co-inoculación con *Bacillus* spp (**MSR**) y *Mesorhizobium* spp (**FBN**) promovió el crecimiento, contenido de clorofila y proteínas y tamaño de semillas de forma significativamente superior al tratamiento control en plantas de garbanzo; de igual forma Antunes *et al.* (2006) determinaron que la asociación entre *Bradyrhizobium japonicum* (**FBN**) y *Glomus clarum* (**HFM**) favorecen la nodulación un 30% más que con solo la presencia del **FBN**, así mismo favorece la floración en plantas de soya.

Tras una revisión exhaustiva de la bibliografía referente al tema se puede determinar que la evaluación *in vitro* e invernadero de la asociación leguminosa arbórea, **FBN**, **MSR** y **HFM** no ha sido reportada y que las investigaciones realizadas hasta el momento no han evaluado el efecto de esta combinación de microorganismos-planta teniendo en cuenta la adaptabilidad de estos al estado del ecosistema en estudio; por lo tanto, este trabajo puede entregar información importante sobre sinergias a favor de la re vegetalización y consiguiente rehabilitación de áreas degradadas por actividades antrópicas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Localización

Los microorganismos se aislaron de la raíces y suelo de la rizosfera de plantas de ***Acacia mangium*** y ***Leucaena leucocephala***, presentes en áreas degradadas por minería de aluvión en la región del Bajo Cauca Antioqueño. Se seleccionaron las plantas que presentaban un desarrollo normal aun en las condiciones desfavorables de la zona y sin haber tenido ningún manejo silvicultural y agronómico durante su desarrollo. Las muestras de suelo rizosférico y raíces de *Acacia mangium* (100 gramos aproximadamente por individuo), se empacaron en bolsas plásticas de cierre hermético debidamente marcadas y se transportaron en neveras de icopor con hielo azul, para mantener una temperatura cercana a los 5°C.

Los nódulos provenientes de *Leucaena leucocephala*, fueron ubicados en tubos falcon de 50 mL con tapa de rosca, que contenían 10 cm³ de sílica gel en su base y una capa de algodón cubriéndola, sobre la cual reposaron los nódulos colectados; al igual que las muestras de suelo y raíces, fueron transportados en nevera de icopor con hielo azul y guardados en nevera hasta ser procesados para el aislamiento de los microorganismos.

Los aislamientos, las pruebas *in vitro* y de invernadero se realizaron en el Laboratorio de Microbiología del Suelo y en el Invernadero de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín (6° 15' N, 75° 35' W y 1495 m de altitud).

4.2. Aislamientos de Microorganismos

Para los aislamientos de microorganismos se siguieron los protocolos específicos de acuerdo al grupo funcional al que pertenece cada uno: Solubilizadores de roca (**MSR**), fijadores biológicos de nitrógeno (**FBN**) y formadores de micorrizas (**HFM**)

- **Microorganismos solubilizadores de roca:** Se usó el medio desarrollado por Kim *et al*, (1997) y modificado por Osorio & Habte, (2001) compuesto así: 1.0 g de NaCl, 0.2 g de CaCl₂·2H₂O, 0.4 g de MgSO₄·7H₂O, 1.0 g de NH₄NO₃, 10 g de glucosa, 7.0 g de agar-agar y 3.5 g de roca fosfórica.

Para aislar los **MSR** de la rizosfera se prepararon diluciones seriales de suelo desde 10⁻² hasta 10⁻⁸ con agua desionizada y estéril. De cada dilución se transfirieron asépticamente alícuotas de 1.0 mL a tubos de ensayo que contenían 15 mL del medio de cultivo mencionado.

En el caso de los microorganismos provenientes de las raíces, estas se lavaron con agua desionizada y estéril, luego se transfirieron a tubos de ensayo que contenían 15 mL del medio de cultivo mencionado.

Para lograr una adecuada homogeneización en cada uno de los medios de cultivo inoculados con las diluciones de suelos o con los fragmentos de las raíces, estos se agitaron en un vórtex durante 20 s y se vertió cada tubo de ensayo en cajas de petri que luego fueron introducidas a una incubadora a 28°C.

Para la selección inicial de los microorganismos se consideraron las colonias que mostraron mayor abundancia y rápido crecimiento, además, se tuvo en cuenta que presentaran zonas de clara dominancia a su alrededor. De cada una de las colonias individuales seleccionadas se realizaron separaciones sucesivas hasta obtener colonias puras (figura 1). Luego éstas se transfirieron a tubos de ensayo con el medio de cultivo respectivo por el método de siembra de agotamiento en superficie y se conservaron a 4 °C, hasta ser utilizadas en la prueba *in vitro*.

- **Bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno (N₂):** Se utilizó el medio BYMA (Caldo Levadura Manitol Agar) compuesto por: 0.1 g de NaCl, 0.2 g de MgSO₄·7H₂O, 0.5 g de KH₂PO₄, 0.5 g de levadura, 10 g de manitol y 20 g de agar-agar por litro. Los aislamientos se realizaron de nódulos activos de *Leucaena leucocephala* previamente esterilizados mediante imbibición por 30 segundos en hipoclorito de sodio al 5%, imbibición en *alcohol al 70% v/v* por un lapso de tiempo de un (1) minuto y por último lavados con abundante agua destilada y estéril. Luego de ser macerados se esparcieron con un asa metálica estéril en la superficie del medio de cultivo utilizando inicialmente rojo congo como indicador y azul de bromotimol para la etapa de purificación de las colonias individuales.
- **Los hongos formadores de micorriza** se aislaron mediante la extracción de esporas de suelo rizosférico de *Acacia mangium* (Brundrett *et al.* 1996; Habte & Osorio, 2001). Luego de realizado el procedimiento de aislamiento, se procedió a determinar el número de esporas por gramo de suelo y separar por morfotipos. Para la selección preliminar de los **HFM** a utilizar se tuvo en cuenta su abundancia en la muestra de suelo, de los morfotipos aislados se tomó un número aproximado de 500 esporas y se llevaron a almacenamiento en una solución de CaCl₂ 0.03 M hasta el momento de evaluar su efectividad.

Todos los medios y materiales utilizados en el proceso de aislamiento y purificación se prepararon con agua destilada, desionizada, luego se esterilizaron en autoclave por 20 minutos a 120°C y 0.1 MPa. |



Figura 1. Colonias individuales de **FBN** aislados de *Leucaena leucocephala*, **MSR** y esporas de **HFM** aislados de *Acacia mangium* respectivamente.

4.3. Prueba *In Vitro*

Las colonias individuales seleccionadas en el proceso de aislamiento y purificación se transfirieron asépticamente, desde las cajas de petri a erlenmeyers que contenían el medio de cultivo líquido respectivo al grupo funcional.

En el caso específico de los microorganismos solubilizadores de roca se observó su efectividad en la solubilización de roca fosfórica y capacidad de multiplicación. Teniendo en cuenta, esta evaluación se seleccionó los **MSR** más eficientes luego de siete días de agitación, dada la cantidad de fósforo soluble en el medio de cultivo líquido, determinado a través del método del azul-molibdato y comparando con una curva estándar (Figura 2.Tabla 1).

Los **FBN** se seleccionaron por su tasa de crecimiento y abundancia, luego de su purificación en medio BYMA con azul de bromotimol y por último los **HFM** fueron escogidos teniendo en cuenta su abundancia en No. esporas por gramo de suelo (Tabla 2). Los datos obtenidos determinaron cuales de estos microorganismos se multiplicaron y sometieron a la prueba en invernadero.

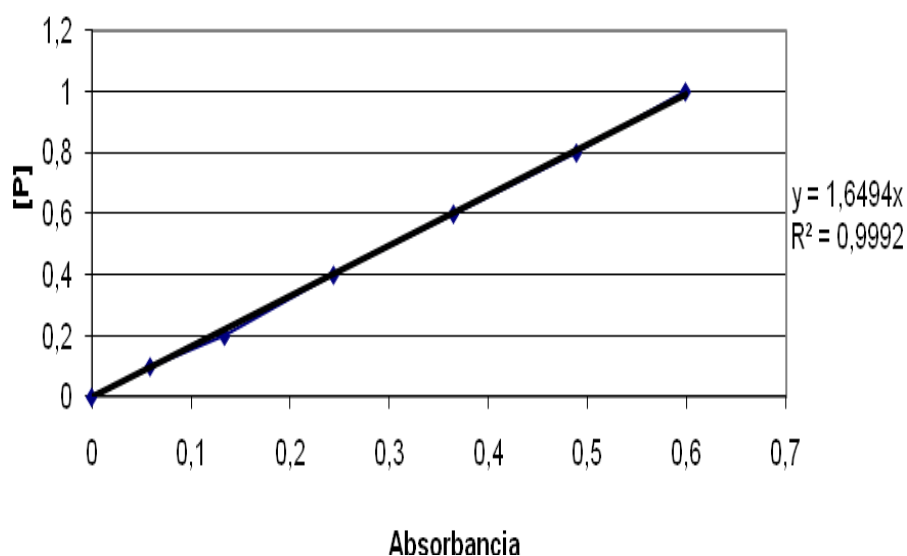


Figura 2. Línea estándar de la concentración de P en solución vs absorbancia para determinación de P en solución generado por la actividad de los **MSR** seleccionados en el proceso de aislamiento y purificación.

4.4. Experimento en Invernadero

Este se llevó a cabo con plántulas de *Leucaena leucocephala* y como sustrato se utilizó suelo degradado por minería de aluvión del Bajo Cauca Antioqueño (zona de estudio), éste suelo se secó al aire y tamizó a 4 mm para garantizar la homogeneidad de la muestra. El sustrato se caracterizó determinando el pH (agua 1:2), P (Bray II y P soluble en agua con 0.01 M CaCl_2), Carbono orgánico, N total, Ca, Mg y K (acetato de amonio 1 M, pH 7), contenido y máxima capacidad de retención de humedad (anexo 7).

Para el establecimiento de las plantas, se utilizaron recipientes plásticos con dimensiones de diámetro y profundidad adecuadas para contener el volumen de sustrato generado por 2.5 kg en base seca (figura 3).



Figura 3. Plantas de *Leucaena leucocephala* en crecimiento.

Al momento de homogeneizar el sustrato, se aplicó roca fosfórica a razón de 300 mg/kg de suelo como única fuente de P, con el fin de establecer una concentración baja pero suficiente para la actividad microbial en la solución del sustrato.

El sustrato se inoculó con 25 mL de inóculo en suspensión para los **FBN** y **MSR** a una concentración mínima de 1×10^8 UFC/ mL (Unidades Formadoras de Colonia por mL) y 25 g del inóculo con **HFM** por kg de suelo. Los tratamientos en los cuales el inóculo no aplicaba, el suelo fue esterilizado en autoclave y se aplicó al sustrato dicho inóculo inactivo.

Las semillas de *Leucaena leucocephala* se sumergieron en ácido sulfúrico concentrado por 20 minutos y posteriormente se lavaron con abundante agua. Luego se pusieron a germinar en cámaras húmedas con agua estéril en el Laboratorio de Microbiología de Suelos de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.

Luego de la germinación, se transfirieron tres semillas a cada pote, pasado un período de tiempo en el cual las plantas se tocaban entre sí se realizó un raleo y se dejó una sola planta por pote, dichas plantas se mantuvieron en crecimiento durante un periodo de 90 días bajo luz natural. El sustrato se humedeció frecuentemente manteniéndolo entre un 50-60% de su máxima capacidad de retención de agua.

4.5. Diseño experimental

Para el ensayo en invernadero se empleó un diseño experimental completamente al azar con cinco repeticiones. En el cual, se realizaron 8 tratamientos, para un total de 40 unidades experimentales. Los tratamientos tuvieron un arreglo factorial $2 \times 2 \times 2$, estos consistieron en la combinación de la inoculación micorrizal (M0: no inoculado, M1: inoculado), la inoculación con bacterias fijadoras de N_2 (F0: no inoculado, F1: inoculado) y la inoculación con un hongo solubilizador de fósforo (P0: no inoculado, P1: inoculado).

1. **M0F0P0:** Testigo (suelo estéril no inoculado + *Leucaena leucocephala*)
2. **M0F1P0:** FBN+ *Leucaena leucocephala*
3. **M0F0P1:** MSR+ *Leucaena leucocephala*
4. **M0F1P1:** FBN+MSR+ *Leucaena leucocephala*
5. **M1F0P0:** HFM+ *Leucaena leucocephala*
6. **M1F1P0:** HFM+FBN+ *Leucaena leucocephala*
7. **M1F0P1:** HFM+MSR+ *Leucaena leucocephala*
8. **M1F1P1:** FBN+MSR+HFM+ *Leucaena leucocephala*

La presencia de diferencias estadísticamente significativas o no entre las medias de cada uno de los tratamientos, se determinó mediante la prueba de rangos múltiples de Tuckey, un ANAVA separando en los tratamientos los siete componentes de la varianza: M, F, P, MxF, MxP, FxP, MxFxP, y la prueba de las mínimas diferencias significativas (LSD) para separar promedios entre efectos de inoculaciones individuales o combinadas.

4.6. Variables respuesta

Para la evaluación final del efecto individual y las interacción de los diferentes microorganismos, se tuvieron en cuenta las variables altura de la planta, masa seca aérea, masa seca de raíces y contenido de P foliar después de 90 días de establecido el sistema en las condiciones de invernadero.

- **Altura de la planta.** El efecto de las inoculaciones microbiales sobre la altura de las plantas se determinó midiendo la longitud desde el cuello de la raíz hasta el ápice al momento de la cosecha.



Figura 4. Determinación de la altura de *Leucaena leucocephala* al momento de cosechar.

- **Masa seca de raíces.** Después de cosechar y medir la parte aérea de la plantas, se procedió a voltear la maseta para extraer la raíz sin deteriorar los pelos radicales, se limpió cada raíz para eliminar el suelo adherido y posteriormente, se llevaron en bolsas de papel a la estufa a 60°C por 72 horas. (figura 5) y se procedió a determinar su peso en una balanza analítica.
- **Masa seca aérea.** Se determinó la masa seca aérea, luego de secar el material vegetal cosechado a 60 °C por 72 horas (figura 5).



Figura 5. Secado de masa seca aérea y raíces.

- **Contenido de P foliar.** Se determinó el P en la cuarta pínula (contando desde la base de la pinna) de la hoja más joven completamente expandida (Habte *et al.* 1987) (Figura 6). La determinación de P se realizó a través del método del azul de molibdato (Murphy & Riley, 1962) luego de haber reducido la pínula a cenizas en mufla a 500°C por 3 horas.

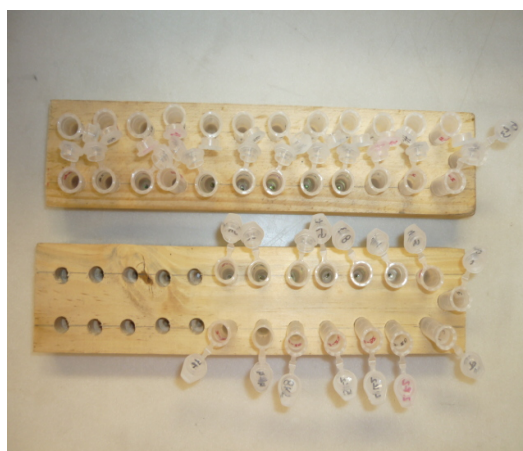


Figura 6. Colecta de la cuarta pínula de *Leucaena leucocephala* para determinación de contenido de P foliar.

5. RESULTADOS y DISCUSIÓN

Aunque el promedio del morfotipo dos (2) es el mayor, la alta variabilidad en los resultados no permitió su selección. Por lo tanto, el microorganismo solubilizador de roca seleccionado para llevar a cabo el ensayo en invernadero fue el morfotipo uno (M1), que presentó diferencia significativa con los demás microorganismos y el control con un promedio de 38.7 mg de P/L en el medio de crecimiento al determinar su capacidad de solubilización de roca fosfórica (Tabla 1).

Tabla 1. Resultados y análisis de varianza del ensayo *in vitro* para determinar solubilización microbial de roca fosfórica en mgP/L. Donde: Mn= morfotipo (n). El pH inicial fue de 7.0.

Tratamiento	Rango de P en solución (mg/L)	Promedio de P en solución (mgP/L)
M1	35.1-42.7	b 38,7
M2	2.6-85.8	a 57,1
M3	0.1-1.7	c 1.0
M4	0.5-0.6	c 0,5
Control (no-inoculado)	0.5-0.6	c 0.6

Cada valor es el promedio de tres repeticiones. Letras distintas denotan diferencia estadísticamente significativa con respecto a los demás tratamientos según la prueba de rangos múltiples de Tuckey.

Análisis de varianza del ensayo *in vitro* para determinar solubilización microbial de roca fosfórica en mgP/L.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr (>F)
Tratamiento	4	8531.9	2132.98	4.7456	0.0290
Residuals	10	4494.7	449.47		

En el laboratorio, al realizar la extracción de esporas de suelo rizosférico, para la selección del inóculo micorrizal, se obtuvo que el morfotipo tres (3) fue el que presentó mayor abundancia, tanto en el tamaño de poro del tamiz de 100 o más μm como en el rango entre 53 y 100 μm (tabla 2).

Tabla 2. Aislamiento de esporas de suelo rizosférico proveniente de la zona de estudio.

Morfotipo (→)	1			2			3			4		
Tamiz (↓)	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
53 μm	37	28	120	18	7	136	50	33	179	32	27	178
	17	12	135	29	12	109	96	41	141	54	67	149
100 μm	4	10	59	9	9	30	7	6	13	17	14	29
	3	3	26	8	5	28	3	10	16	8	9	26
Total por morfotipo	61	43	340	64	33	303	156	90	349	111	117	382
Promedio de esporas por morfotipo /g de suelo	12	9	68	13	7	61	31	18	70	22	23	76

Se realizaron 4 repeticiones del conteo y diversidad de esporas, el morfotipo 3 tuvo un promedio general de 69 esporas por gramo de suelo, donde la muestra consistió en 5 g de suelo rizosférico en base seca.

5.1. Altura de la planta

Con respecto a la variable altura, se encontró que la inoculación micorrizal individual fue la más eficiente, mostrando diferencias significativas sobre los demás tratamientos a favor de la altura de la planta. Aunque, todos los tratamientos en los que **HFM** estaban en consorcio con **MSR** o **FBN** y **FBN+MSR** mostraron diferencias significativas con respecto al control, se tiene que no existe un efecto sinérgico, por el contrario, la co-inoculación parece ejercer un efecto mitigante del papel de las micorrizas por sí solas (Anexo 1). Por otro lado, al analizar los efectos individuales se observó que los tratamientos que no incluyeron **HFM**, no evidenciaron contrastes, siendo estadísticamente semejantes al control (figura 7).

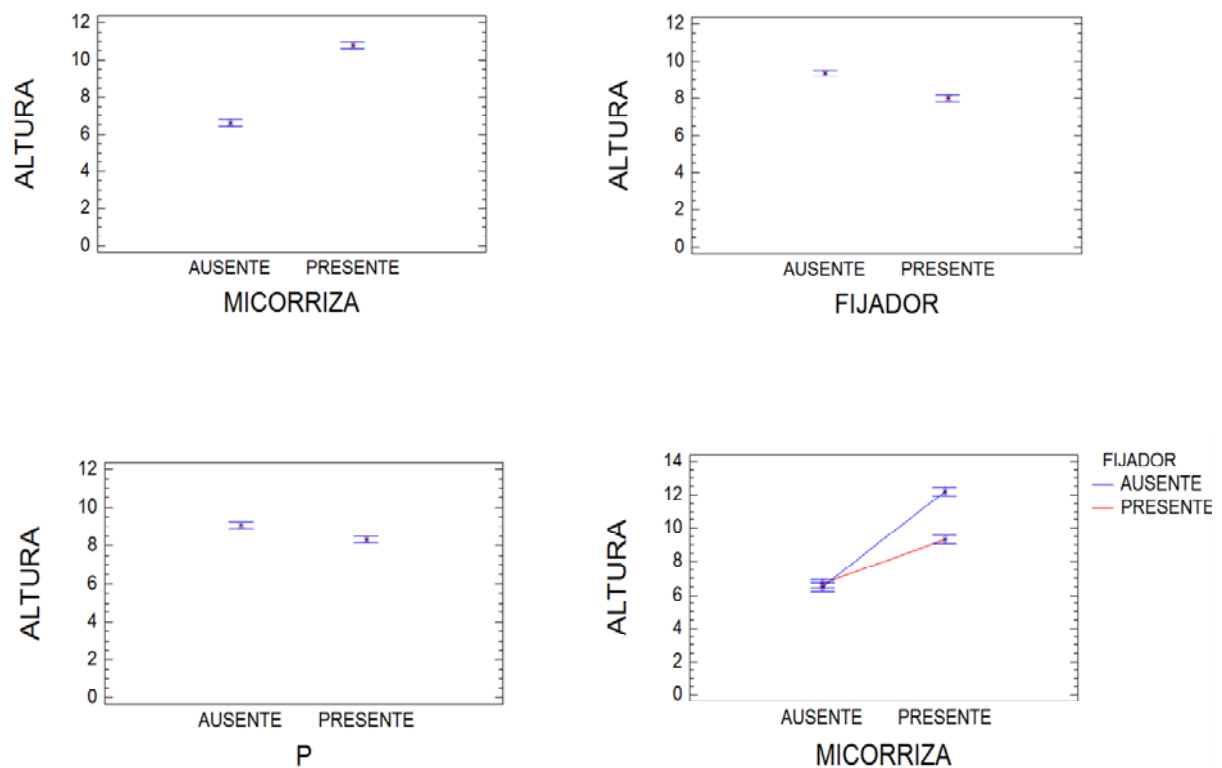


Figura 7. Altura de plantas (cm) de *Leucaena leucocephala* en función de la inoculación individual y combinada con un hongo micorrizal, una bacteria fijadora de N_2 y un microorganismo solubilizador de fósforo. (Ausente: no inoculado, presente: inoculado). Intervalos no traslapados en la horizontal denotan diferencia significativa entre los promedios comparados.

Los resultados muestran que las micorrizas juegan un papel benéfico sobre la altura de las plantas, en aquellos tratamientos donde se encuentran asociadas, esto se hace evidente al observar la comparación de medias, en donde, los tratamientos sin micorrizas obtienen valores muy cercanos e inferiores al control.



Figura 8. Altura de plantas de *Leucaena leucocephala* inoculadas con HFM frente a las no inoculadas

Aunque, en este trabajo, se evaluaba la respuesta en el crecimiento con base a la utilización de un consorcio de microorganismos. Es reconocido el efecto de las micorrizas sobre el desarrollo de las plantas, así, que no se hace difícil atribuir la diferencia encontrada entre los tratamientos micorrizados y los no micorrizados principalmente a la inoculación con **HFM**.

Las interacciones de la inoculación individual y combinada muestran que existe diferencia significativa entre aplicar y no aplicar **HFM**, siendo, la aplicación de estos más favorable a la altura de la planta. También, se tiene que las aplicaciones individuales de los inóculos con y sin **MSR** o con y sin **FBN** muestran diferencias significativas entre ellos, mostrando menor favorabilidad a la altura, el hecho de inocular con dichos microorganismos de forma individual, contrario a lo ocurrido con el inóculo micorrizal (Figura 7).

Numerosos trabajos, han reportado la capacidad que presentan las raíces para establecer simbiosis con microorganismos del suelo como los **HFM**, como una estrategia para colonizar ecosistemas terrestres (Rilling, 2004); se ha observado, que el beneficio de las micorrizas se traduce en mayor crecimiento y desarrollo de las plantas optimizando la adaptación al medio y la eficiencia en la absorción de nutrientes minerales del suelo, algunos tan importantes como el fósforo y el agua (Habte & Osorio, 2001; Osorio, 2007), que dadas las condiciones ambientales y de deterioro en algunos casos podría ser inaccesibles de no existir la asociación. Es tan vital el papel de las micorrizas que algunos autores que como Parniske, (2004), considera la simbiosis entre plantas y **HFM** como la más importante interacción en entre plantas y microorganismos.

5.2. Masa Seca de Raíces

En esta variable, se hizo muy notoria la acción de los **HFM**, ya que el tratamiento donde actúan en forma individual las micorrizas, fue el único que mostro diferencias significativa con respecto al control. Todos los demás tratamientos, no fueron estadísticamente distintos (Anexo 1). El tratamiento que más se acercó fue el que combinaba la inoculación **HFM+MSR**, sin embargo, estuvo casi un 40% por debajo en su efecto sobre el peso seco de las raíces y no mostró diferencias significativas con el control.

Los datos obtenidos coinciden con lo expuesto por Yano *et al.* (1998), que encontraron que la longitud específica de la raíz fue mayor en los tratamientos inoculados con **HFM** que los no inoculados, también, se tiene que Zangaro *et al.* (2005) estudiaron la relación entre **HFM** y las características morfológicas de la raíz y plantearon que especies pioneras y secundarias tempranas como lo es la *Leucaena leucocephala* que generalmente exhiben raíces finas con densos y largos pelos absorbentes, mostraron alta respuesta micorrizal, la cual fue altamente correlacionada con la colonización micorrizal. En este sentido, Janos, (1980) plantea que la respuesta micorrizal y la colonización se correlacionan directamente con la longitud de la raíz.

Igualmente, Kapulnik & Kluwer, (2001) reportan que la respuesta de las plantas a la colonización por **HFM** de sus raíces, es muy variable dependiendo principalmente, de los requerimientos nutricionales, estado fisiológico, ciclo de vida, morfología del sistema de raíces y la capacidad de absorción.

Si se observa nuevamente, se tiene que a medida que se hace mayor el consorcio microbial, en el tratamiento **HFM+FBN+MSR**, el peso de las raíces se asemeja cada vez más al de los tratamientos donde no hay acción micorrizal (Anexo 1). Dado los resultados obtenidos y vista la opinión de otros autores, cabría preguntarse si la co- inoculación a mayor complejidad inhibe el efecto en la raíz que de forma individual tienen las micorrizas y en el caso de darse a que se debe.

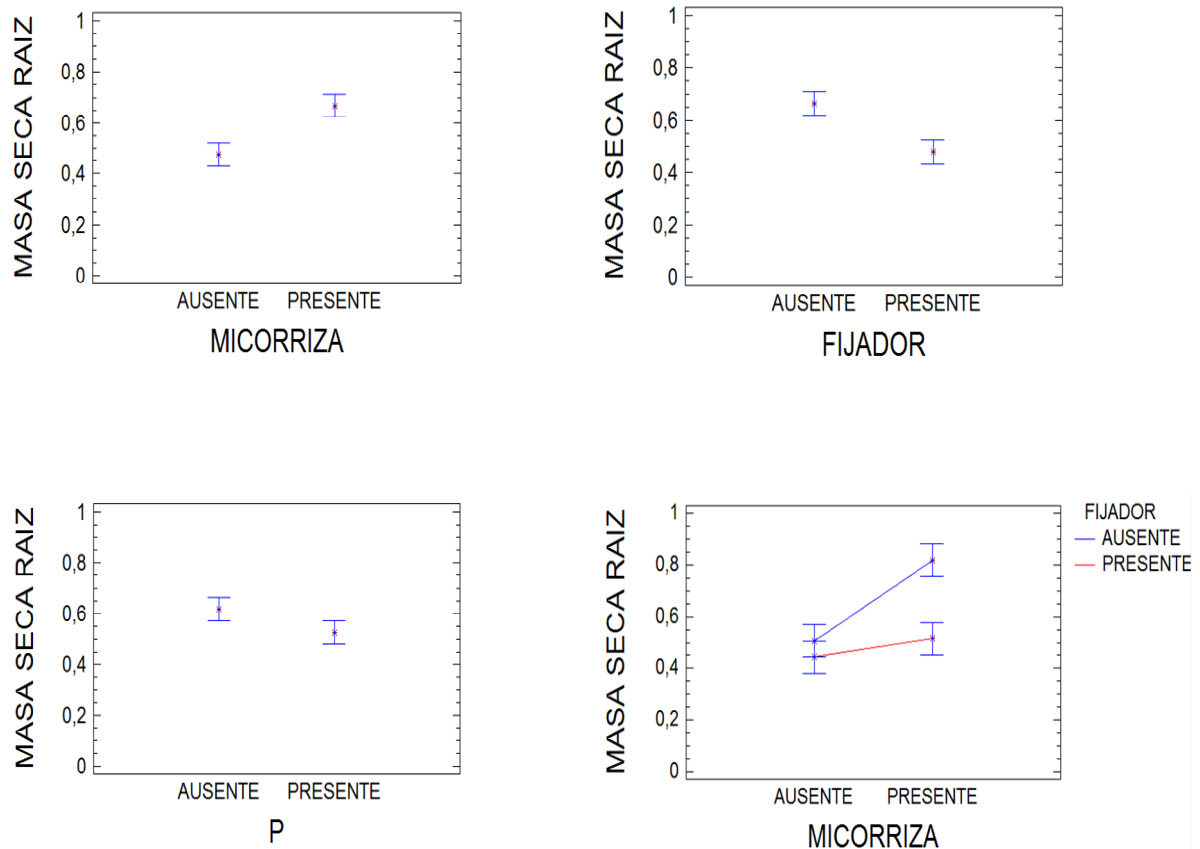


Figura 9. Masa seca (g) de la raíz de plantas de *Leucaena leucocephala* en función de la inoculación individual y combinada con un hongo micorrizal, una bacteria fijadora de N_2 y un microorganismo solubilizador de fósforo. (Ausente: no inoculado, presente: inoculado). Intervalos no traslapados en la horizontal denotan diferencia significativa entre los promedios comparados.

La variable masa seca de raíz muestra un comportamiento similar al de la variable altura al realizar el análisis en función de la inoculación individual y combinada, donde, se hace notorio que las inoculaciones sean con **FBN** o **MSR**, de forma individual no favorecen la variable analizada, mostrando un valor significativamente menor a la no inoculación. Por otro lado, se tiene que la interacción **FBN** en presencia de un **HFM** no muestra diferencias significativas con la interacción **FBN** en ausencia de un **HFM**, lo cual indica que la presencia del **FBN** podría estar afectando negativamente el papel individual que tendría el **HFM** en lo que respecta al desarrollo de la raíz de *Leucaena leucocephala* (figura 9).

5.3. Masa seca aérea (MSA)

Los datos indican que si hubo respuesta significativa de la masa seca aérea, a las inoculaciones con micorrizas de forma individual, superando el efecto benéfico sobre el desarrollo de las plantas que se tuvo con el asocio de estas con los demás microorganismos. Datos que concuerdan con lo reportado por varios autores en diversos estudios. Por ejemplo, la inoculación con **HFM** incrementa la producción de aminoácidos, proteínas, clorofila y contenido de azúcares comparada con plantas no micorrizadas (Mathur & Vyas, 2000), incrementan la captación de nutrientes (Johansen *et al.* 1993; Jakobsen *et al.* 1992; Sieverding, 1991) y tienen un efecto positivo en la salud de las mismas (Avis *et al.* 2008). lo que, lógicamente repercute directamente en el desarrollo vegetal y por supuesto en una mayor biomasa.

Dentro de los tratamientos donde se combinaron micorrizas con otros microorganismos se puede observar que las diferencias, aunque existen, con respecto al control, la co-inoculación no ejerce un efecto codayudante en la masa seca aérea, por el contrario, se tiene que las interacciones **HFM+FBN**; **HFM+MSR**; **HFM+FBN+MSR** son menos eficientes que la acción individual del hongo formador de micorriza (Anexo 1).

El comportamiento al analizar las interacciones entre **HFM** y **FBN** es similar a las situaciones anteriores, donde la inoculación micorrizal de forma individual es más eficiente y muestra diferencia significativa con la co- inoculación (figura 10).

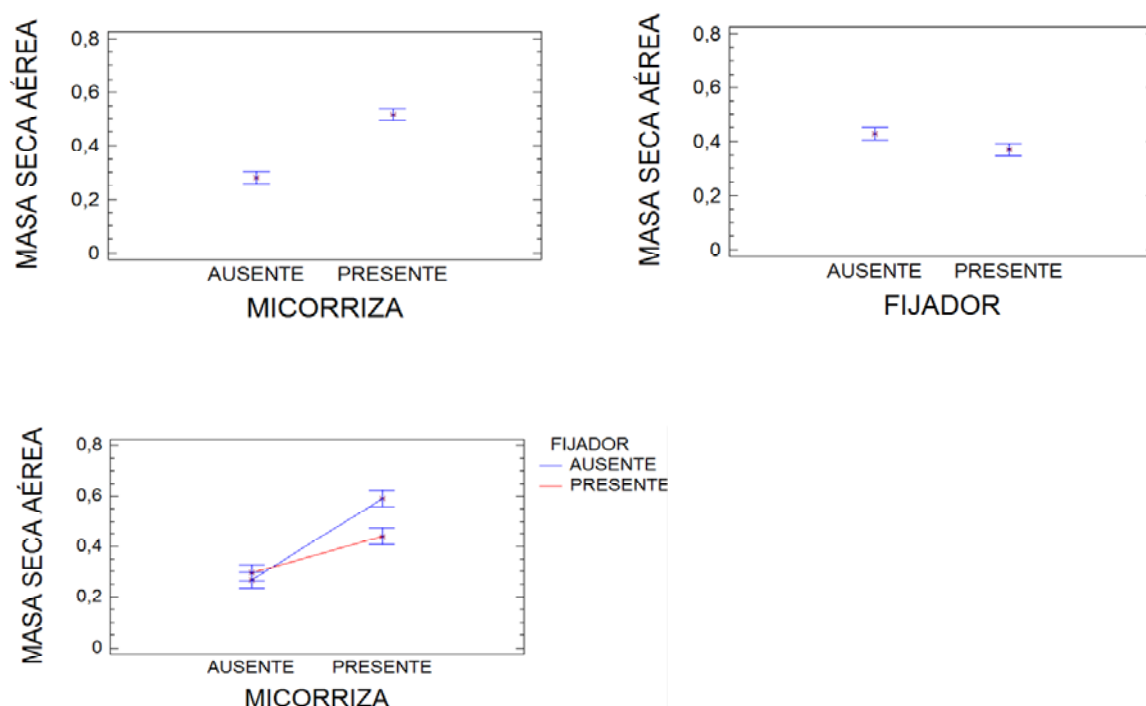


Figura 10. Masa seca aérea (g) de plantas de *Leucaena leucocephala* en función de la inoculación individual y combinada con un hongo micorrizal y una bacteria fijadora de N₂. (Ausente: no inoculado, presente: inoculado). Intervalos no traslapados en la horizontal denotan diferencia significativa entre los promedios comparados.

5.4. Contenido de P en las pínulas y P total absorbido (PTA)

El fósforo total, presente en la parte aérea difirió significativamente en respuesta a la inoculación con micorrizas frente a los demás tratamientos y al control (anexo 1), sin embargo, se tuvo también que aunque hay un aumento en la concentración de P foliar, los tratamientos que involucran **HFM+FBN** y **HFM+FBN+MSR** muestran un punto intermedio en el cual no muestran diferencias con los tratamientos donde actuaban las micorrizas solas y en conjunto con solubilizadores , ni con los tratamientos en los cuales no había inoculación micorrizal.

En el comportamiento de la variable P, contenido en la cuarta pínula se ve claramente que existe una gran diferencia entre utilizar **HFM** o no. Aunque el tratamiento en el cual hay una combinación **HFM+MSR** fue el mejor desde el punto de vista de cantidad, no muestra diferencias estadísticamente significativas, con los demás tratamientos en los cuales también se usó micorrizas, donde todos fueron sustancialmente distintos a los tratamientos sin hongos formadores de micorriza incluido el control (anexo 6).

El tipo de respuesta, en la cual el tratamiento que contenía **MSR+HFM** presenta el valor más alto de fósforo foliar, está bien documentado en trabajos como los de Sieverding, (1991) y Smith *et al.* (2003). Sin embargo, en este experimento dicho tratamiento no mostró diferencia significativa con las inoculaciones que involucraron **HFM** de forma individual o combinada.

Al analizar el fósforo absorbido, en la parte aérea de la planta de *Leucaena leucocephala* en función de la inoculación individual con **HFM** y con **FBN**, se tiene que la interacción de la inoculación individual o no con **FBN**, difiere estadísticamente, notándose que la inoculación individual con FBN no favorece la absorción de P por parte de la planta. Además, al analizar el comportamiento de la aplicación o no del Hongo Formador de Micorriza se demuestra que la presencia del inóculo micorrizal definitivamente mejora la toma de P por parte de la planta (figura 11).

Es claro que el P es un elemento primordial en el desarrollo vegetal, por lo cual, la captación de P por los **HFM** y la liberación de éste de la fracción mineral, hacia la solución del suelo por los **MSR** son roles que se hacen deseables (Abbot & Robson, 1992; López *et al.* 2004).

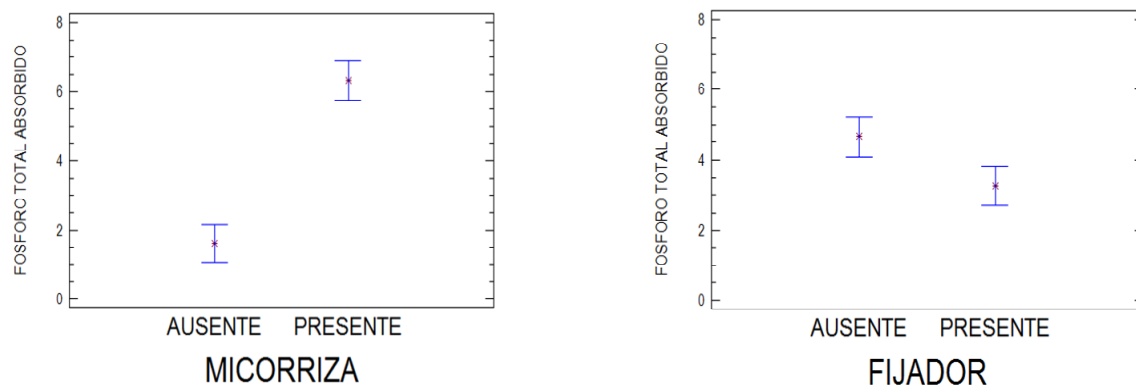


Figura 11. Fósforo absorbido (mg) en la parte aérea de plantas de *Leucaena leucocephala* en función de la inoculación individual con un hongo micorrizal y una bacteria fijadora de N₂. (Ausente: no inoculado, presente: inoculado). Intervalos no traslapados en la horizontal denotan diferencia significativa entre los promedios comparados.

La Información obtenida en este experimento, concuerda en todos y cada uno de los resultados obtenidos donde la altura, masa seca aérea, la cantidad de fósforo absorbido por las planta se incrementó en los tratamientos que contenían **HFM**, secundado en la mayoría de las veces sin mostrar diferencia significativa con el anterior por la asociación **HFM+MSR** (anexo 1).

6. CONCLUSIONES

1. Con los protocolos establecidos, se logró aislar y purificar desde la rizosfera de plantas de *Leucaena leucocephala* y *Acacia mangium* creciendo en suelos degradados por minería de aluvión, microorganismos de cada uno de los grupos funcionales preestablecidos en función del desarrollo de este experimento.
2. Las pruebas desarrolladas en el laboratorio permitieron seleccionar de forma adecuada los microorganismos que sea por su eficiencia en su función o por su abundancia y dominancia, serían sometidos a la prueba de invernadero para determinar su efecto en forma individual o combinada en el desarrollo de *Leucaena leucocephala*.
3. En general, se obtuvo que los inóculos microbiales sean de forma individual o en consorcios, en los que no haya presencia de micorrizas no tienen un efecto positivo y significativo en la altura de las plantas, con respecto al control. Sobre esta variable específica las micorrizas por si solas fueron las más efectivas por sobre las co-inoculaciones; aunque, no hubo diferencia estadísticamente significativa con el tratamiento donde actúan en consorcio con **MSR** en tres (3) de las cuatro variables analizadas.

Con este trabajo, se reconfirma que las micorrizas facilitan la nutrición vegetal mediante una más eficiente absorción de nutrientes, incluidos los de baja movilidad, lo que favorece el crecimiento y el desarrollo de las plantas, permitiéndoles ser más competitivas y presentar una mayor productividad. Sin embargo, al tratarse de un estudio que busca aumentar las posibilidades de éxito al establecer plantas en suelos pobres nutricionalmente y físicamente, se debe tener en cuenta que para este ensayo el sustrato fue enriquecido con roca fosfórica y que ésta, no es totalmente insoluble, lo que implica que en la solución del suelo se presentaría cierta cantidad de **(P)** no necesariamente liberado por la actividad microbiana, esto llevaría a que en algún momento ese **(P)** soluble inicial se agote y como se sabe los **HFM** no tienen capacidad solubilizadora, por lo que en un periodo de tiempo mayor podría llegar a tener mayor relevancia la co-inoculación **HFM-MSR**.

4. Los resultados que se obtuvieron mostraron que los tratamientos donde actúan micorrizas en forma individual, fueron los más influyentes en todas y cada una de las variables respuestas analizadas. Este comportamiento, permite concluir que al momento de establecer *Leucaena leucocephala* en zonas degradadas es deseable la inoculación con **HFM** ya que la probabilidad de éxito se incrementa notablemente.
5. La generación de asociaciones microbiales en las cuales se involucraron consorcios **HFM+MSR+FBN** o **HFM+FBN** o **HFM+MSR**, no favorecieron el desarrollo de la planta más allá de lo que se hizo por el **HFM** de forma individual.

6. La *Leucaena leucocephala* mostró ser una planta óptima para el establecimiento de investigaciones acerca de la restauración o rehabilitación de áreas degradadas, ya que dió una muy buena respuesta a cada uno de los tratamiento y una supervivencia del 100% al ensayo en general. Por otro lado, es una especie con gran cantidad de usos y rapido crecimiento, como se detalló en el marco teórico.

7. BIBLIOGRAFÍA

- ABBOTT, L. and ROBSON, A.D. 1992. Factors influencing the occurrence of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 35: 121-150.
- ABED EL KAEDER, D; MOLINA, E. A; MONTERO, K. C; GUTIERREZ, O; TRANCONE, G; LEÓN DE PINTO, G. 2008. Datos analíticos de la goma de la semilla de *Leucaena leucocephala*. *Revista de la Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia, Venezuela*. Vol 25 pp 95-108.
- ALLEN, M. 1989. The ecology of arbuscular mycorrhizas: a look back into the 20 th century and a peek into the 21th . *Mycological Research*, 100 (7): pp 769-782.,
- ÁLVAREZ, C., J.C. ZULUAGA, E. GÓMEZ Y F.H. OROZCO. 1997. Asociación maní inoculado con *Bradyrhizobium* spp. Y pasto *Brachiaria dictyoneura* en suelos degradados por minería de aluvión. *Suelos Ecuatoriales*. 27: 231-234
- ANTUNES, P.M; DEAVILLE, D; GOSS, M.J. 2006. Effects of two AMF life strategies on the tripartite symbiosis with *Bradyrhizobium japonicum* and soybean. *Mycorrhiza*. Vol 16 pp 167-173.
- ATLAS, R.M; R. BARTHA. 2002. *Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental*. PEARSON EDUCACIÓN S.A. Madrid. España.
- AVIS, T.J; GRAVEL, V; ANTOUN, H; TWEDDELL, R.J. 2008. Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. *Soil Biology and Biochemistry*. Vol 40 pp 1733-1740.
- AZCON, C; J.M. BAREA. 1996. Interacciones de la micorrizas arbusculares con microorganismo de la rizosfera, 47-68 p. In: Guerrero, E. (Ed.). *Micorrizas. Recurso Biológico del Suelo*. FEN, Bogota, Colombia.
- BAREA, J.M., R. AZCON; D.S. HAYMAN. 1975. Possible synergistic interactions between endogone and phosphate-solubilizing bacteria in low-phosphate soils, 409-417 p. In: Mosse, B. and P.B. Tinker (Eds.). *Endomycorrhizas*. London, Academic Press.
- BAREA, J.M; McNEIL, A.M; PRIGENT-COMBARET, C. RICHARDSON, A.E. 2009. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and Soil*. Vol 321 pp 305-339.
- BARRIOS, E. 2007. Soil biota, ecosystem services and land productivity. *Ecological Economics*. Vol 64 pp 269-285.

- BASHAN, Y; HOLGUIN, G; de-BASHAN, L.E. 2004. *Azospirillum*-plant relationship: Physiological, molecular, agricultural and environmental advances (1997-2003). Canadian Journal of Microbiology. Vol 50 pp 521-577.
- BASHAN, Y; KHAOSAAD, T; SALAZAR, B.G; OCAMPO, J.A; WIEMKEN, A; OEHL, F; VIERHEILING, H. 2007. Mycorrhizal characterization of the boojum tree, *Fouquieria columnaris*, an endemic ancient tree from the Baja California Peninsula, Mexico. Trees, Vol 21, pp 329-335.
- BASHAN, Y; PUENTE, M.E; SALAZAR, B; de-BASHAN, L.E; BACILIO, M; HERNADEZ, J.P; LEYVA, L.A; ROMERO, B; VILLALPANDO, R; G.J. BETHLENFALVAY. 2006. reforestation of eroded land in the desert. Role of plant growth promoting bacteria and organic matter. Suelos Ecuatoriales, Vol 35 No 1 pp 70-77.
- BOLAN, N. S. 1991. A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. Plant and Soil, 134:189-207.
- BOTELHO, R; MELLONI, R; PEREIRA, E.G. 2006. Microbiologic and biochemical attributes as indicator of recovery of degraded areas, in ITAJUBÁ/MG. Cerne Levrás. Vol 12 No 1, pp 48-55.
- BOTERO, R; RUSSO, R. 2005. Utilización de árboles y arbustos fijadores de nitrógeno en sistemas sostenibles de producción animal en suelos ácidos tropicales. Rev. EARTH. pp 1-19.
- BRADY, N.C; R.R. WEIL. 1999. The nature and properties of soils. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey.
- BRUNDRETT, M. N; BOUGHER, B. DELL, T. GROVE; N. MALAJCZUK. 1996. Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. Austarlian Centre for International Agriculture Research. Monograph 32, 374 p.
- BURBANO. O, H. 1989. El suelo: una vista sobre sus componentes biorgánicos. Universidad de Nariño. Serie investigaciones N°1. Pasto. 447 p.
- BURNS, R.C and R.F. HARDY. 1975. Nitrogen Fixation in Bacteria and Higher Plants. Springer-verlag. New York. USA.
- CAIRNEY, C.D; GRAYSTON, S.J; HIRST, D.J. 1997. Use of rhizosphere carbon sources in soil and the lasting impact of cultivation. Microbiology and Ecology. 42, 11-21.

- CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y DE ENSEÑANZA (CATIE). 1992. Proyecto cultivo de árboles de uso múltiple. *Acacia mangium willd.* Especie de árbol de uso múltiple en América Central. Turrialba, Costa Rica.
- CHEN, X; TANG, J. J; ZHI, G. Y; HU, S. J. 2005. Arbuscular mycorrhizal colonization and phosphorus acquisition of plant: Effects of coexisting plant species. *Applied Soil Ecology*, Vol 28, pp 259-269.
- DALTON, H. 1974. Fixation of dinitrogen by free-living microorganisms. *Critical Review in Microbiology*. Vol 3, pp 183-260.
- DAZA, P.C; PELAEZ, J.A; OSORIO, N.W; LEON, J.D. 2006. Aislamiento y evaluación de microorganismos solubilizadores de fosfatos de bosques altoandinos en Colombia. *Suelos Ecuatoriales*, Vol 35 No 2, pp 45-52.
- De-BASHAN, L. E; HOLGUIN, G; GLICK, B.R; BASHAN, Y. 2007. Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales. En: *Microbiología agrícola: Hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico, planta-microorganismo*. (Eds.) Ferrera-Cerrato, R; and Alarcón, A. Chapter 8. Published by: Editorial Trillas. Mexico City. pp 170-224.
- DEGENS, B.P. 1997. Macro-aggregation of soils by biological bonding and binding mechanisms and the factors affecting these: A review. *Aust. J. Soil Res.* Vol 35, pp 431-459.
- DILLWORTH, M.J and A.R. GLENN. 1991. *biology and Biochemistry of Nitrogen Fixation*. Elsevier. Amsterdam.
- DODD, J.C; BODDINGTON, C.L; RODRIGUEZ, A; GONZALEZ-CHAVES, C; MANSUR, L. 2000. Mycelium of arbuscular micorrizal fungi (AMF) from different genera: Form, function and detection. *Plant and Soil* 226, pp 131-151.
- EVANS H, J; G. STACEY; R.H, BURRIS. 1991. *Biological Nitrogen Fixation*. Chapman and Hall. New York. USA.
- FERNÁNDEZ, L. A; ZALBA, P; GOMEZ, M. A; SAGARDOY, M. A. 2007. Phosphate-solubilization activity of bacterial strains in soil and their effects on soybean growth under greenhouse conditions. *Biol. Fertil. Soils*. Vol 43 pp 805-809.
- FERRARI, A.E; WALL, L.G. 2004. Utilización de árboles fijadores de nitrógeno para la revegetación de suelos degradados. *Rev. Fac. Agr. La Plata*. 105(2). pp 63-87.

- FILION, M; ST-AMAUD, M; FORTIN, J.A. 1999. Directs interation between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and different rhizosphere microorganisms. *New phytol.* 141. pp 525-523.
- GALINDO, J; GONZALES, N, DELGADO, D; SOSA, A; MARRERO, Y; GONZALES, R; ALDANA, A.I; MORERIA, ONIDIA. 2008. Efecto modulador de *Leucaena leucocephala* sobre la microbiota ruminal. *Cuba, Zootecnia tropical*, Vol 26 No 3 pp 249-252.
- GALINDO, T; POLLANIA, J; SANCHEZ, J; MORENO,N; VANEGAS,J; HOGUIN, G. 2006. Efecto de inoculantes microbianos sobre la promocion de crecimiento de plantulas de Mangle y plantas de *Citrullus vulgaris*, San Andres Isla, Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, Vol 11 No 1 pp 83-97.
- GALLOWAY, J.N; COWLING, E.B. 2002. Reactive nitrogen and the world: 22 years of change. *AMBIO Journal* Vol 31 No 2 pp 64-74.
- GARCIA, A; LEONDELALUZ J.L; BASHAN, Y; BETHLENFALVAY, G.L. 1999. Nurse plants, mycorrhizae, and plants establishment in a disturbed area of the Sonoran desert. *Restor Ecol*, Vol 7 pp 321-335.
- GEORGE, E; MARSCHNER, H; JAKOBSEN, I. 1995. Role of arbuscular mycorrhizal fungi in uptake of phosphorous and nitrogen from soil. *Crit. Rev. Biotechnol.* 15. pp 257-270.
- HABTE, M; N.W. OSORIO. 2001. Arbuscular Mycorrhizas: Producing and applying Arbuscular Mycorrhizal Inoculum. Departament of Tropical Plant and Soil Science, College of Tropical Agriculture and Human Resources (C.T.A.H.R), University of Hawaii, Honolulu. 47 pp.
- JAKOBSEN, I.; L.K. ABBOTT; A.D. ROBSON. 1992b. External hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Trifolium subterraneum* L. 2. Hyphal transport of ³²P over defined distances. *New Phytologist*, 120, pp 509-516.
- JANOS, D.P. 1980. Vesicular- arbuscular micorrhizae affect lowland tropical rain forest plant growth. *Ecology.* 61, pp 51-162.
- JEFFRIES, P; GIANINAZZI S and S. PEROTTO. 2003. The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant healt and soil fertility. *Biol and fertility of soils*, Vol 37 No 1.
- JIMÉNEZ, M; Y PICADO V. W. 1987. Algunas experiencias con *Acacia mangium* en Costa Rica. *Silvoenergia* No 22. Costa Rica.

- JOHANSEN, A.; I. JAKOBSEN, and E.S. JENSEN. 1993. External hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Trifolium subterraneum* L. 3. Hyphal transport of ^{32}P and ^{15}N . *New Phytologist*. 120, pp 61-68.
- KAPULNIK, I; KLUWER, D. DOUDS. 2001. Arbuscular mycorrhizas: physiology and function. *Geoderma*, 104, pp 345-346.
- KIM, K.Y., D. JORDAN; G.A. MCDONALD. 1998. *Enterobacter agglomerans*, phosphate solubilizing bacteria and microbial activity in soil. Effect of carbon sources. *Soil Biology and Biochemistry*, 30, pp 995-1003.
- KIM, K.Y., G.A. MCDONALD; D. JORDAN. 1997. Solubilization of hydroxyapatite by *Enterobacter agglomerans* and cloned *Escherichia coli* in culture medium. *Biology and Fertility of Soils*, 24:347-352.
- KLIRONOMOS, J.N; McCUNE, J; HART, M; NEVILLE, J. 2000. The influence of arbuscular micorrhizae on the relationship between plant diversity and productivity. *Ecol. Lett.* 3, 137-141.
- KOHLER, J; CARAVACA, F; CARRASCO, L; ROLDAN, A. 2007. Interactions between a plant growth-promoting rhizobacterium an AMF fungus and a phosphate-solubilizing fungus in the rhizosphere of *Lactuca sativa*. *Applied Soil Ecology* Vol 35 pp 480-487.
- KUCEY, R.M.N. 1983. Phosphate solubilising bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. *Canadian Journal of Soil Science*, 63, pp 671-678.
- LADHA, J.K; REDDY, P.M. 2003. Nitrogen fixation in rice systems: State of knowledge and future prospects. *Plant and Soil* Vol 252 No 1 pp 151-167.
- LINDERMAN, R.G. 1988. Mycorrhizal interaction with the rhizosphere microflora: The mycorrhizosphere effect. *Phytopathology*, 78, pp 366-371.
- LÓPEZ GUTIÉRREZ, J.C. TORO, M. LÓPEZ-HERNÁNDEZ, D. 2004. Arbuscular mycorrhiza and enzymatic activities in the rhizosphere of *Trachypogon plumosus* Ness. in three acid savanna soils *Agriculture. Ecosystems and Environment*, 103, pp 405–411
- LÓPEZ, N. 2009. Aluviones auríferos en Colombia, geología e historia de su exploración y producción. *Mineros S.A.*
- LYNCH, J.M. and WHIPPS, J.M. 1990. Substrate flow in the rhizosphere. *Plant and Soil*. 129, pp 1-10.

- MATHUR, N; VYAS, A. 2000. Influence of arbuscular mycorrhizae on biomass production, nutrient uptake and physiological changes in *Ziziphus mauritiana* Lam. under water stress. *Journal of Arid Environments*. 45, pp 191-195.
- MATIAS, S.R; PAGANO, M.C; CARVALHO MUZZI, CH. 2009. Effect of rhizobia, fungi mycorrhizal fungi and phosphate- solubilizing microorganisms in the rhizosphere of native plants in degrade area. *European Journal of soil biology*. Vol 45 pp 259-266.
- MEDINA, M; OROZCO, F.H; MÁRQUEZ, M.E. 2009. Diversidad de hongos micorrizógenos arbusculares de una crono-secuencia de suelos aluviales degradados por actividad minera en el Bajo Cauca Antioqueño, Colombia. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín*. 62(1), pp 4749-4759.
- MILLER, R.M; JASTROW, J.D. 1990. Hierarchy of root and mycorrhizal fungal interactions with soil aggregation. *Soil Boil. Biochem*. 22, pp 579-584.
- MISHRA, P.K; MISHRA, S; SELVAKUMAR, G. BISHT, J.K; KUNDU, S; GUPTA, H.S. 2009. Coinoculation of *Bacillus thuringiensis*-KR1 whit *Rhizobium leguminosarum* enhances plant growt and nodulation of pea (*Pisum sativum* L) and lentil (*Lens culinaris* L). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. Vol 25 pp 753-761.
- MOLIN, J; MOLIN, S. 1997. CASE: Complex adaptive systems ecology. In: Jones, J.G. (Ed), *Advances in Microbial Ecology*, Vol 15. Plenum, New York, pp 27-79.
- ODONNELL, A.G; SEASMAN, M; MACRAE, A; WAITE, L; DAVIES, J.T. 2001. Plants and fertilizers as drivers of change in microbial community structure and function in soil. *Plant and Soil*. 232, pp 135-145.
- OLIVA, E; Y HUGHELL, D. 1990. Modelos de crecimiento y rendimiento de *Acacia mangium willd* en Costa Rica, Honduras y Panamá. *Silvoenergía* No 35.
- OROZCO, F.H; GÓMEZ, E. 1994. "Recuperación" biológica de suelos: 48 – 59. En: Sociedad Colombiana de la Ciencia del Suelo (SCCS) Comité Regional de Santander (ed). *Memorias del VII Congreso Colombiano de la Ciencia del Suelo "El componente bioorgánico del suelo"*, Bucaramanga.
- OSORIO VEGA, N. W. 2007. A review on beneficial effects of rhizosphere bacteria on soil nutrient availability and plant nutrient uptake. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*. Vol 60 No 1, pp 3621-3643.
- OSORIO. N.W. 2003. Aislamiento y evaluación de microorganismos solubilizadores de P de tres suelos de Hawai. Tesis de maestría. Universidad de Hawaii, Honolulu. USA.

- OSORIO, N. W; HABTE M. 2001. Synergistic Influence of an arbuscular mycorrhizal fungus and a P solubilizing fungus on growth and P uptake of *Leucaena leucocephala* in an oxisol. *Arid Land Research and Management* 15 (3), pp 263-274.
- OUAHMANE, L; THIOULOUSE, J; HAFIDI, M; PRIN, Y; DUCOUSSO, M; GALIANA, A; PLENCHETTE, C. KISA, M. DUPONNOIS, R. 2007. Soil functional diversity and P solubilization from rock phosphate after inoculations with native or allochthonous arbuscular mycorrhizal fungi. *Forest Ecology and Management*. Vol 247 pp 200-208.
- OUZOUNIDOU, M; SKODRA, A; KOKKOFITIS, C; STOUKIDES, M. 2007. Catalytic and electrocatalytic synthesis of NH_3 in a H^+ conducting cell by using an industrial Fe catalyst. *Solid State Ionics*, Vol 178 pp 153-159.
- OVREAS, L. 2000. population and community level approaches for analysing microbial diversity in natural environments. *Ecol. Lett.* 3, pp 236-251.
- PACE, N.R. 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* 276, 734-740.
- PARNISKE, M. 2004. Molecular genetics of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Biology*. 7, pp 414-421.
- PARVAZE, A. W, SAGHIR, K. M; ALMAS Z. 2007. Synergistic effects of the inoculation with nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing rhizobacteria on the performance of field-grown chickpea. *Journal of plant nutrition and soils science*. Vol 170, No 2 pp 283-287.
- PARROTTA, J. A. 1991. Effect of an organic biostimulant on early growth of *Casuarina equisetifolia*, *Eucalyptus tereticornis*, *Leucaena leucocephala*, and *Sesbania sesban* in Puerto Rico. *Nitrogen Fixing Tree Research Reports*. 9, pp 50-52
- PEOPLES, M.B; LADHA, J.K; HERRIDGE, D.F. 1995. Enhancing legume N_2 fixation through plant and soil management. *Plant and Soil*, Vol 174 pp 83-101.
- POSTGATE, J. 1992. *Nitrogen Fixation*. Cambridge University Press. New York. USA.
- RAO, S. 1992. *Biofertilizers in Agriculture*. El Sevier publishing, Amsterdam.
- REQUENA, N; JEFFRIES, P; BAREA, J.M. 1996. Assessment of natural mycorrhizal potential in a desertified semiarid ecosystem. *Applied Environment Microbiology*. Vol 62, pp 842-847.
- RILLING, M. 2004. Arbuscular mycorrhizae and terrestrial ecosystem processes. *Ecology Letters*. 7, pp 740–754.

- RENDÓN M, J.E. 1998. Caracterización de aislados de la familia rizobiaceae de suelos degradados por minería de aluvión del Bajo Cauca Antioqueño. Trabajo de Grado Ingeniería Agronómica, Universidad Nacional de Colombia, Medellín. 107 p.
- ROSAS, S.B; ANDRES, J.A; ROVERA, M; CORREA, N.S. 2006. Phosphate-solubilizing *Pseudomonas putida* can influence the rhizobia-legume symbiosis. Soil Biology & Biochemistry, Vol 38 pp 3502-3505.
- ROY, S; KHASA, D.P; GREER, C.W. 2007. Combining alder, Frankiae, and mycorrhizae for the revegetation and remediation of contaminated ecosystems. Canadian Journal Bot. Vol 85, pp 237-251.
- RUDRESH, D. L; SHIVAPRAKASH, M. K; PRASAD, R. D. 2005. Effects of combined application of Rhizobium, phosphate solubilizing bacteria and Trichoderma ssp. On growth, nutrient uptake and yield of chickpea (*Cicer aritenium* L.). Applied Soil Ecology, Vol 28 pp 139-146.
- SANCHEZ, N.B; VIÑALES, A.M; PADRÓN, C.M. 2003. Prueba de especies forestales en áreas devastadas por minería a cielo abierto en Holguín. Centro Agrícola. Año 30 no.1 pp 80-83.
- SATPAL, S & KAPOOR, K. K. 1998. Effects of inoculation of phosphate-solubilizing microorganisms and an arbuscular mycorrhizal fungus on mungbean grown under natural soil conditions. Mycorrhiza, Vol 7 pp 249-253.
- SIEVERDING, E. 1991. Vesicular-Arbuscular mycorrhiza management. Editorial GTZ, Eschbor, 57-72.
- SIEVERDING, E. 1988. La micorriza un componente biotecnológico en la producción vegetal. Ciencia y tecnología 7 (1): 9-11.
- SMITH S.E. SMITH, A; JAKOBSEN I. 2003. Mycorrhizal Fungi Can Dominate Phosphate Supply to Plants Irrespective of Growth Responses. Plant Physiology, September. 133, pp 16–20.
- SMITH, K.P; GOODMAN, R.M. 1999. Host variation for interactions with beneficial plants-associated microbes. Annu. Rev. Phytopathol. 37, pp 473-491.
- SOMASEGARAN, P; H.J. HOBEN. 1994. Handbook for Rhizobia. Springer-Verlag. New York. USA.
- SOUCHIE, E. L; AZCON, R; BAREA, M. J; SAGGIN-JUNIOR, O. J; RIBEIRO da SILVA, E. M. 2006. phosphate solubilization and Synergism between P-solubilizing and arbuscular mycorrhizal fungi. Pesquisa agropec brasileira. Vol 41 No 9, pp 1405-1411.

- SOUCHIE, E.L & de SOUZA ABOUD, A.C. 2007. Phosphate solubilization by microorganisms the rhizosphere of Pigeon pea genotypes grown in different soil classes. Seminario: Ciencias Agrarias, Londrina, Vol 28 No 1, pp 11-18.
- SOUCHIE, E.L; CARMEIRA CAMPELLO, E.F; SAGGIN-JUNIOR, O.J; RIBEIRO da SILVA, E.M. 2005. Mudanças de espécies arbóreas inoculadas com bactérias solubilizadoras de fosfato e fungos micorrízicos arbusculares. Floresta, Curitiba, PR, Vol 35 No 2, pp 329-334.
- SPRENT, J; SPRENT P. 1990. Nitrogen Fixing organisms, pure and applied aspects. Chapman and Hall. London. 256 pp.
- SRIVASTAVA, D; Kapoor, R; SRIVASTAVA, S.K; MUKERJI, K.G. 1996. Vesicular arbuscular micorriza—an overview. In: Mukerji, K.G. (Ed), Concepts in Mycorrhiza Research. Kluwer Academic Publishing. Netherlands, pp 1-39.
- THORN, G. 1997. The fungi in soil. In: van Elsas, J.D; Trevors, J.T; Wellington, E.M-H. (Eds), modern Soil Microbiology. Marcel Dekker, New York. pp 63-127.
- TIMONEN, S; FINLAY, R.D; OLSSON, S; SODERSTROM, B. 1996. Dynamics of phosphorous translocation in intact ectomycorrhizal system: Non-destructive monitoring using a B-scanner. FEMS Microbiol. Ecol. 19, pp 171-180.
- TISDALL, J.M. 1991. Fungal hyphae and structural stability of soil. Aust. J. Soil Res. 29, pp 729-743.
- TORO, M; AZCON, R; BAREA, J.M. 1997. Improvement of arbuscular mycorrhiza development by inoculation of soil with phosphate-solubilizing rhizobacteria to improved rock phosphate bioavailability (P_{32}) and nutrient cycling. Applied and Environmental Microbiology. Vol 63 No 11, pp 4408-4412.
- TORSVIK, V; DAAE, F.L; SANDAA, R.A; OVREAS, L. 1998. Review article: Novel techniques for analyzing microbial diversity in natural and perturbed environments. Journal of Biotechnology. 64, pp 53-62.
- TORSVIK, V; GOKSOYR, J; DAAE, F.L. 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 56, pp 782-787.
- TREVORS, J.T. 1998. Molecular Evolution in Bacteria: cell division. Rev. Microbiology. 29. pp 237-245.

- TRUJILLO, E. 2007. Guía de reforestación. Los árboles: adaptación, características, madera, usos, rendimientos, silvicultura. Edit. Profanor del Ecuador S.A. Bogotá, Colombia. pp 99-101.
- TYLER, G. 1994. Ecología y medio ambiente. Grupo editorial ibero América. México, 867 p.
- UHLMANN, E; GORKE, C; PETERSEN, A; OBERWINKLER, F. 2006. Arbuscular mycorrhizae from arid parts of Namibia. *Journal Arid environment*. Vol 64, pp 221-237.
- URZÚA, H. 2005. Beneficios de la fijación simbiótica en Chile. *Revista Ciencia e Investigación Agropecuaria*, Pontificia Universidad Católica De Chile. Vol 32 No 2, pp 133-150.
- VAN DER HEIJDEN, M.G.A; KLIRONOMOS, J.N; URSUC, M; MOUTOGLIS, P; STREITWOLF-ENGEL; BOLLER, T; WIEMKEN, A; SANDERS, L.R. 1998. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 396. pp 62-72.
- VAN ELSAS, J.D; FROIS-DUARTE, G; KEIJZER-WOTERS, A; SMIT, E. 2000. Analysis of the dynamics of fungal communities in soil via fungal specific-PCR of soil DNA followed by denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiology. Methods* 43. pp 133-151.
- VANCE P.C. 2001. Symbiotic Nitrogen Fixation and phosphorous acquisition. *Plant Nutrition in a World of declining renewable resource*. *Plant physiology*. Vol 127, pp 390-397.
- VESSEY, J.K. 2003. Growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*. 255, pp 571-586.
- WALL, D.H and VIRGINIA, R.A. 1999. Controls on soil biodiversity: Insights from extreme environments. *Applied Soil Ecology*. 13, pp 137-150.
- WANI, P.A; KHAN, M.S; ZAIDI, A. 2007. Co-inoculation of nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing bacteria to promote growth, yield and nutrient uptake in chickpea. *Acta Agronomica Hungarica*. Vol 55 No 3 pp 315-323.
- WHITELAW, M.A. 2000. Growth Promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. *Advances in Agronomy*, 69, pp 99-151.
- WOOD, P. 1980. Specificity in the interactions of direct dyes with polysaccharides. *Carbohydrate Res*. 85, pp 271-287.
- WRIGTH, S.F & UPADHYAYA, A. 1996. Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein from arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Sci*. 161, pp 575-586.

- WRIGTH, S.F & UPADHYAYA, A. 1998. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 198, pp 97-107.
- WRIGTH, S.F., FRANKE, S.M., MORTON, J.B. & UPADHYAYA, A. 1996. Time-course study and partial characterization of a protein on hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi during active colonization of roots. *Plant Soil* 181, pp 193-203.
- YANO, K. YAMAUCHI, A. LIJIMA, M. KONO, Y. 1998. Arbuscular mycorrhizal formation in undisturbed soil stress for pigeon pea. *Applied Soil Ecology*, 10, pp 95-102.
- YAO, H; HE, Z; WILSON, M.J; CAMPBELL, C.D. 2000. microbial biomass and community structure in a sequence of soil with fertility and changing land use. *Microbiology and Ecology*. 40, 223-237.
- ZANGARO, W. NISHIDATE, F.P. SPAGO, F.R. ROMAGNOLI, G.G. and VANDRESSEN. 2005. Relations among arbuscular mycorrhizas, root morphology and seedling growth of tropical native woody species in southern Brazil. *Journal of Tropical Ecology*, 21, pp 529-540.
- ZÁRATE, S. 1987. *Leucaena leucocephala* (Lam) de wit Subsp *glabrata* rose. *Phytologia* Vol 64 No 4, pp 304-306.

8. ANEXOS

Anexo 1. Valores y diferencias estadísticas de cada una de las variables respuesta para cada uno de los tratamientos por la prueba de rangos múltiples de Tuckey.

TRATAMIENTO	altura de la planta (cm)	peso seco parte aérea (g)	peso seco raíz (g)	contenido total de p foliar (mg P/planta)
M0F0P0	6,850	0,3012	0,4384	2,0450
M0F1P0	6,800	0,2706	0,4045	1,6442
M0F0P1	5,800	0,1972	0,4021	1,0317
M0F1P1	6,650	0,2864	0,4710	0,8960
M1F0P0	12,35	0,6397	1,1362	10,2301
M1F1P0	10,35	0,4588	0,5578	5,5866
M1F0P1	11,95	0,5317	0,7165	8,2567
M1F1P1	8,650	0,3743	0,4282	4,3704

Los valores entre paréntesis indican la media obtenida para el tratamiento.

Anexo 2. Análisis de varianza separando en los tratamientos los siete componentes de la varianza para la variable respuesta Altura.

Analysis of Variance for ALTURA - Type III Sums of Squares					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:MICORRIZA	173,056	1	173,056	566,24	0,0000
B:FIJADOR	18,225	1	18,225	59,63	0,0000
C:SOLUBILIZADOR	5,776	1	5,776	18,90	0,0001
INTERACTIONS					
AB	24,025	1	24,025	78,61	0,0000
AC	0,9	1	0,9	2,94	0,0958
BC	0,001	1	0,001	0,00	0,9547
ABC	0,961	1	0,961	3,14	0,0857
RESIDUAL	9,78	32	0,305625		
TOTAL (CORRECTED)	232,724	39			
All F-ratios are based on the residual mean square error.					

Anexo 3. Análisis de varianza separando en los tratamientos los siete componentes de la varianza para la variable respuesta Peso Seco Raíz.

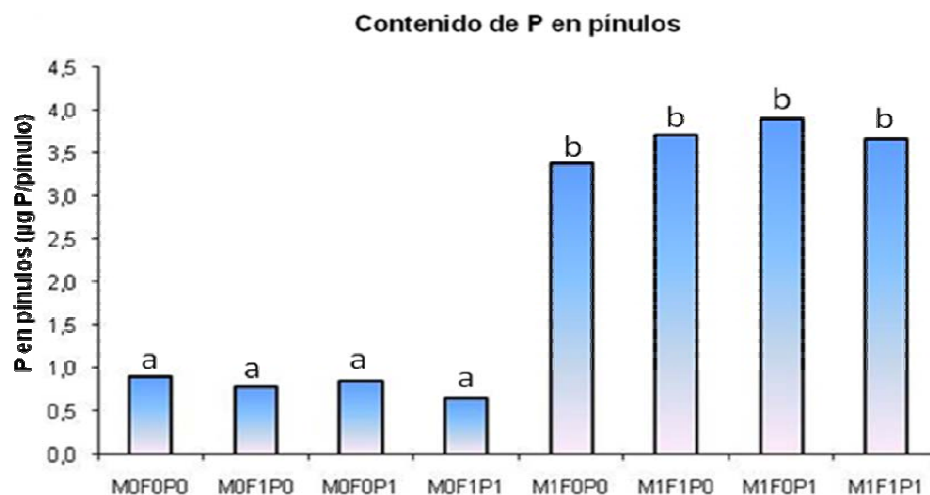
Analysis of Variance for PESO RAI2 - Type III Sums of Squares					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:MICORRIZA	0,369812	1	0,369812	19,19	0,0001
B:FIJADOR	0,339241	1	0,339241	17,60	0,0002
C:SOLUBILIZADOR	0,08375	1	0,08375	4,34	0,0452
INTERACTIONS					
AB	0,144637	1	0,144637	7,50	0,0100
AC	0,0703502	1	0,0703502	3,65	0,0651
BC	0,0592823	1	0,0592823	3,08	0,0891
ABC	0,0656667	1	0,0656667	3,41	0,0742
RESIDUAL	0,616807	32	0,0192752		
TOTAL (CORRECTED)	1,74955	39			
All F-ratios are based on the residual mean square error.					

Anexo 4. Análisis de varianza separando en los tratamientos los siete componentes de la varianza para la variable respuesta Masa Seca Aérea.

Analysis of Variance for PESO AEREO - Type III Sums of Squares					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:MICORRIZA	0,550231	1	0,550231	110,22	0,0000
B:FIJADOR	0,0375769	1	0,0375769	7,53	0,0099
C:SOLUBILIZADOR	0,00443102	1	0,00443102	0,89	0,3532
INTERACTIONS					
AB	0,0808201	1	0,0808201	16,19	0,0003
AC	0,000638401	1	0,000638401	0,13	0,7230
BC	0,0049284	1	0,0049284	0,99	0,3279
ABC	0,00173186	1	0,00173186	0,35	0,5600
RESIDUAL	0,159747	32	0,00499209		
TOTAL (CORRECTED)	0,840104	39			
All F-ratios are based on the residual mean square error.					

Anexo 5. Análisis de varianza separando en los tratamientos los siete componentes de la varianza para la variable respuesta Fósforo Total Absorbido.

Analysis of Variance for FOSFORO TOTAL - Type III Sums of Squares					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:MICORRIZA	223,02	1	223,02	73,98	0,0000
B:FIJADOR	19,0854	1	19,0854	6,33	0,0171
C:SOLUBILIZADOR	3,1416	1	3,1416	1,04	0,3150
INTERACTIONS					
AB	10,2313	1	10,2313	3,39	0,0747
AC	1,6769	1	1,6769	0,56	0,4612
BC	3,6663	1	3,6663	1,22	0,2783
ABC	2,03852	1	2,03852	0,68	0,4170
RESIDUAL	96,4616	32	3,01443		
TOTAL (CORRECTED)	359,322	39			
All F-ratios are based on the residual mean square error.					



Anexo 6. Concentración foliar de fósforo en la cuarta pinula de Leucaena en respuesta a los tratamientos. Letras diferentes sobre las columnas denotan diferencia significativa entre los promedios comparados.

Anexo 7. Análisis de suelos antes y después de ensayo en invernadero

Código	Identificación en el campo	Textura				pH	C.E.	M.O.	Al	Ca	Mg	K	Na	CICE	P
		A%	L%	Ar%	Clase	dSm-1	%			cmolc	Kg -1			mg	Kg -1
SI2572	Antes de ensayo					5.9	0.7	-	8.3	4.6	0.04			12.9	13
SI3329	M1F0P1	82	12	6	AF	6.3	1.5	-	8.0	3.5	0.17			11.7	97
SI3330	M1F1P0	82	12	6	AF	6.5	1.5	-	8.3	3.6	0.15			12.1	98
SI3331	M1F1P1	82	12	6	AF	6.5	1.6	-	8.1	3.5	0.19			11.8	88
SI3332	M1F0P0	82	12	6	AF	6.6	1.5	-	8.6	3.7	0.18			12.5	101
SI3333	M0F0P0	82	12	6	AF	6.9	1.4	-	8.3	3.6	0.18			12.1	86
SI3334	M0F1P0	82	12	6	AF	6.8	1.3	-	7.8	3.5	0.18			11.5	91
SI3335	M0F0P1	82	12	6	AF	6.8	1.6	-	8.1	3.6	0.23			11.9	78
SI3336	M0F1P1	82	12	6	AF	6.9	1.6	-	8.4	3.7	0.120			12.2	69